



| UNR

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

**“Desarrollo de herramientas para la producción de
proteínas recombinantes en *Corynebacterium glutamicum*”**

Presentada por: Lic. Pablo Ravasi

**Director: Hugo G. Menzella
Rosario, Argentina
2016**

**“Desarrollo de herramientas para la producción de proteínas recombinantes en
Corynebacterium glutamicum”**

Pablo Ravasi

Licenciado en Biotecnología

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Procesos Biotecnológicos y Químicos de Rosario (IPROBYQ), área Ingeniería Genética y Tecnología de Fermentación, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre el 1 de Abril de 2011 y el 10 de Diciembre de 2015, bajo la dirección del Dr. Hugo G. Menzella.

Agradecimientos

A Hugo por dejarme ser parte de algo distinto a todo lo que nos habían enseñado.

A Salvador por los clonados y las guerras de DJs.

A Eugenia por adoptarme luego del cambio de lab y pasar a ser parte importante de este proyecto.

A todos mis compañeros del laboratorio por bancarse mis neurosis y ataques de minimalismo.

A Mariana por estar siempre conmigo en cada paso, por el aguante, los consejos y todo lo que va a venir.

Divulgación

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- **Ravasi P.**, Braia M., Eberhardt F., Elena C., Cerminati S., Peirú S., Castelli M.E., Menzella H.G. 2015. **High-level production of *Bacillus cereus* phospholipase C in *Corynebacterium glutamicum*.** J Biotechnol. 216:142-148.
- Elena C., **Ravasi P.**, Castelli M.E., Peiru S., Menzella H.G. 2014. **Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives.** Front Microbiol. 5:21.
- **Ravasi P.**, Peiru S., Gramajo H., Menzella HG. 2012. **Design and testing of a synthetic biology framework for genetic engineering of *Corynebacterium glutamicum*.** Microbial Cell Factories. 11:147.

Índice

| | |
|---|----|
| Abreviaturas | I |
| Introducción | 1 |
| Acerca de <i>Corynebacterium glutamicum</i> | 2 |
| Características generales y fisiológicas | 3 |
| <i>Corynebacterium</i> como modelo de organismo productor de compuestos de interés industrial | 6 |
| Sistemas de producción de proteínas recombinantes | 9 |
| Sistemas de expresión bacterianos | 9 |
| Sistemas de expresión en levaduras | 11 |
| Hongos filamentosos | 13 |
| Células de mamíferos | 15 |
| Ventajas de <i>C. glutamicum</i> para la producción de compuestos de interés industrial | 17 |
| Producción de enzimas recombinantes en <i>C. glutamicum</i> | 19 |
| Biología sintética | 20 |
| Biología sintética en <i>C. glutamicum</i> | 22 |
| Desgomado enzimático de aceites | 23 |
| Objetivos | 27 |
| Materiales y métodos | 29 |
| Cepas | 30 |
| Medios de cultivos | 30 |
| Genes sintéticos | 30 |
| Determinación del crecimiento microbiano | 30 |
| Transformación de <i>C. glutamicum</i> | 31 |
| Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> | 31 |
| Geles de poliacrilamida | 31 |
| Electroforesis de ácidos nucleicos | 32 |
| Digestión con endonucleasas de restricción | 32 |
| Ligado de fragmentos de ADN | 32 |
| Experimentos de expresión | 32 |
| Medida de fluorescencia y absorbancia de los cultivos | 33 |

| | |
|---|----|
| Cuantificación de la intensidad de las bandas de geles de poliacrilamida | 33 |
| Secuenciación de ADN | 33 |
| Preparación plasmídica | 33 |
| Ensayo colorimétrico de actividad fosfolipasa | 34 |
| Ensayo colorimétrico para determinar los parámetros cinéticos de BC-PLC | 34 |
| Resonancia magnética nuclear de aceite crudo y tratado con PLC | 34 |
| Introducción de mutaciones utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (crossover PCR) | 35 |
| Purificación enzimática | 36 |
| Ensayo de desgomado enzimático a escala de laboratorio | 36 |
| Determinación del contenido de DAGs | 36 |
| Secuenciación Amino terminal | 37 |
| Ruptura celular por sonicación | 37 |
| Cultivos de alta densidad de <i>C. glutamicum</i> | 37 |
| Resultados y discusión | 39 |
| Capítulo 1 | 40 |
| Resultados | 41 |
| Diseño racional de un vector de expresión estándar para <i>C. glutamicum</i> . | 41 |
| Diseño y construcción | 41 |
| Validación experimental: | 44 |
| Análisis sistemático de elementos regulatorios involucrados en la biosíntesis de proteínas en <i>C. glutamicum</i> | 44 |
| Ensayo <i>in vivo</i> de actividades promotores y RBSs | 44 |
| Ensayo <i>in vivo</i> de operones y unidades transcripcionales independientes en <i>C. glutamicum</i> | 47 |
| Ensayos <i>in vivo</i> de actividad de un gen reportero variando elementos no relacionados con la regulación de la expresión génica | 50 |
| Variación de la concentración del inductor | 50 |
| Intercambio de orígenes de replicación en <i>C. glutamicum</i> | 51 |
| Discusión | 55 |
| Capítulo 2 | 59 |
| Introducción | 60 |

| | |
|---|-----|
| Sistemas de secreción de proteínas en bacterias | 60 |
| El sistema Sec | 60 |
| El sistema Tat | 62 |
| Resultados | 64 |
| Producción y secreción de proteínas recombinantes en <i>C. glutamicum</i> | 64 |
| Análisis sistemático de secuencias señales del sistema Tat | 64 |
| Sobreexpresión de la maquinaria del sistema Tat | 66 |
| Producción de proteínas de interés industrial | 70 |
| Expresión y secreción de BC-PLC | 71 |
| Determinación de la actividad PLC | 74 |
| Secuenciación amino terminal y activación proteolítica | 75 |
| Optimización de la secuencia de la BC-PLC para la expresión en <i>C. glutamicum</i> | 78 |
| Discusión | 82 |
| Capítulo 3 | 87 |
| Introducción | 88 |
| Resultados | 89 |
| Escalado de la producción de BC-PLC y desgomado enzimático | 89 |
| Desarrollo del proceso de producción de BC-PLC en cultivos de alta densidad | 89 |
| Desgomado enzimático a escala de laboratorio a partir de BC-PLC recombinante | 92 |
| RMN de de aceite tratado con BC-PLC | 93 |
| Discusión | 94 |
| Conclusiones | 97 |
| Resumen | 100 |

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---|
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| DO ₆₀₀ | Densidad óptica a 600nm |
| kDa | Kilodaltons |
| IPTG | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido |
| PNOPC | O-(4-Nitrofenilfosforil)colina |
| p/v | Peso en volumen |
| v/v | Volumen en volumen |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| DAG | Diacylglicerol |
| TAG | Triacylglicerol |
| PLC | Fosfolipasa C |
| BC-PLC | Fosfolipasa C de <i>Bacillus cereus</i> |
| g/L | Gramos por litro |
| gPS/L | Gramos peso seco por litro |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| PVDF | Polivinildeno biftuoruro |
| RBS | Sitio de unión a ribosoma |

Introducción

Acerca de *Corynebacterium glutamicum*

Corynebacterium glutamicum fue aislado originalmente en Japón por Shukuo Kinoshita, Shigezo Udaka y Masakazu Shimono en la compañía Kyowa Hakko Kogyo, mientras buscaban un organismo que pudiera producir glutamato extracelularmente [1].

El glutamato monosódico, descubierto en los inicios del siglo 20 por el profesor Ikeda, es conocido como un ingrediente que realza el sabor de las comidas usadas tradicionalmente en la cocina japonesa. Después de la segunda guerra mundial, la escasez de comida y especialmente de comidas ricas en proteínas fue uno de los mayores inconvenientes. Fue en ese momento el glutamato comenzó a ser utilizado para condimentar las comidas desabridas que en ese momento eran accesibles para la población. Sin embargo el L-glutamato era producido por descomposición química de los granos de soja y trigo y resultaba demasiado costoso [2]. Es por esto que varios grupos de investigadores japoneses planearon obtenerlo a partir procesos fermentativos. La producción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico, mediante este tipo de procesos tenía ya en aquella época una larga historia de investigación e industrialización en Japón. El camino más sencillo hasta el momento era utilizar cepas de *Pseudomonas* capaces de transformar azúcar consumida en ácido α -cetoglutarico, precursor del L-glutamato. Luego, distintos métodos tanto químicos como enzimáticos eran aplicados sobre el mismo para obtener el L-glutamato [3]. En el año 1956 Shigezo Udaka junto a sus colaboradores comenzaron las investigaciones a partir de las cuales desarrollaron un método de screening muy eficiente, el cual les permitió encontrar a partir de aislados ambientales una bacteria capaz de producir este valioso compuesto naturalmente. El método consistía en utilizar placas de agar con un medio rico sobre las cuales se estriaban colonias de distintos aislados ambientales. Luego las mismas eran expuestas luz UV con el objetivo de matar los microorganismo y a continuación se cubría la placa con una capa de soft agar, la cual contenía un cultivo de *Leuconostoc mesenteroides*, una especie auxótrofa por el ácido glutámico. De esta manera, el crecimiento de este microorganismo indicaba que la colonia subyacente era capaz de producir y secretar ácido glutámico al medio extracelular [4].

El microorganismo, inicialmente llamado *Micrococcus glutamicus* No. 534, reveló en estudios siguientes la capacidad de acumular ácido glutámico

dependiendo de las concentraciones de biotina presentes en el medio, lo cual sugirió que esta vitamina cumplía un rol fundamental en la fisiología de esta especie. Luego, mediante sucesivos experimentos de mutagénesis y descubrimientos acerca de las principales vías de regulación, se encontraron que muchos aminoácidos de interés tales como lisina, arginina, ornitina y treonina también podían ser producidos por esta cepa. A partir de ese momento surgió a una nueva visión en la industria producción de aminoácidos a nivel global a partir de esta nueva especie conocida actualmente como *Corynebacterium glutamicum* [5]. A mediados de los años 80 se comenzaron a secuenciar genes aislados de esta especie, lo cual permitió caracterizar y analizar varias vías biosintéticas involucradas en la síntesis de aminoácidos. Estos avances, permitieron comenzar más adelante con trabajos de ingeniería metabólica, con el fin de optimizar la producción de estos compuestos [6-8]. Desde hace más de una década, se encuentran disponibles las secuencias de genomas completos de diferentes cepas de *C. glutamicum* [9, 10].

Características generales y fisiológicas

Luego de la primera descripción como *Micrococcus glutamicus*, un gran número de nombres diferentes le fueron asignados a distintos aislados de *Corynebacterium glutamicum*. Entre ellos *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium divaricatum* y *Corynebacterium lilium* hasta que esta confusión con los nombres fue resuelta por la publicación de Liebl, la cual demostró por diversos métodos taxonómicos que todos los aislados pertenecían a la misma especie [11].

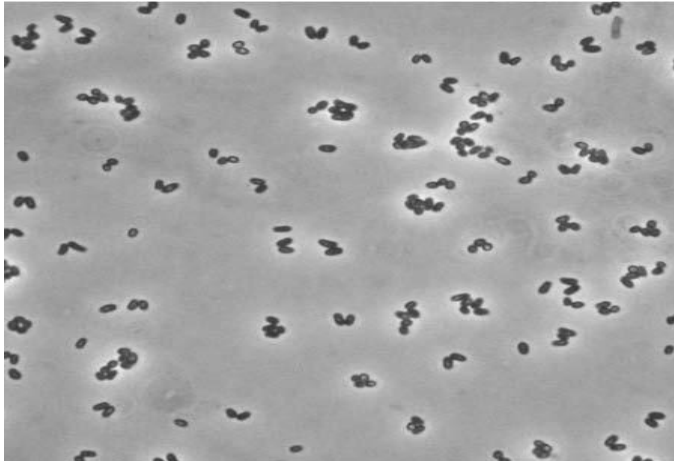
C. glutamicum es una bacteria Gram positiva que pertenece al orden de los Actinomicetales. La misma es no patogénica, no esporogénica, anaerobia facultativa y con un contenido de G+C moderadamente alto (58%). El género *Corynebacterium* se encuentra muy relacionado a los géneros *Micobacterium* y *Nocardiaceae*, los cuales colectivamente forman el suborden de las eubacterias y son capaces de habitar diversos nichos ecológicos como el suelo, vegetales, la piel y los desagües [5, 11].

Las células de *C. glutamicum* no presentan movilidad y bajo el aumento del microscopio este tipo de bacterias se observa con forma de bastón. Usualmente se

encuentran en forma de “V”, debido al mecanismo de separación durante su división celular (Figura 1).

Figura 1

A



B

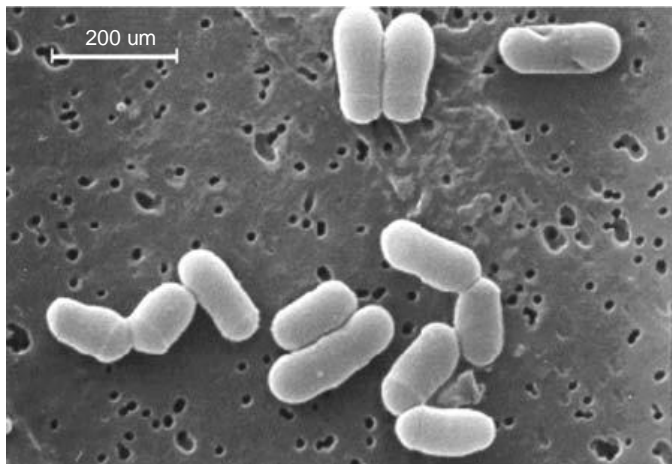


Figura 1. Microscopias de células de *C. glutamicum*. (A) Micrografía de contraste de fase de células crecidas en un medio complejo donde se pueden observar los usuales arreglos en forma de “V” que ocurren durante la división celular. (B) Mismo preparado de células pero visto desde una microscopia electrónica de barrido [5].

La mayoría de las Corynebacterias tienen una pared celular compleja la cual difiere de las de otras Gram positivas típicas. La misma consiste en una membrana plasmática, formada por una bicapa lipídica típica, cubierta por una capa de peptidoglicano (Figura 2). Esta última está unida a una cubierta de arabinogalactano,

la cual se encuentra además esterificada con otra capa de ácidos micólicos exterior formando un gran complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano dentro de la cual también se encuentran presentes los polisacáridos solubles lipoarabinomanano (LAM) y lipomamano (LM). Esta estructura resulta funcionalmente equivalente a la membrana exterior de las Gram negativas, responsable de la resistencia y permeabilidad en esta especie. Por último, existe una capa superficial llamada “S”, la misma cumple funciones tanto como capa protectora así como tamiz molecular y se encuentra compuesta principalmente por la proteína PS2, codificada por el gen *cspB*, además de glicanos de alto peso molecular y lípidos [12-14].

Figura 2

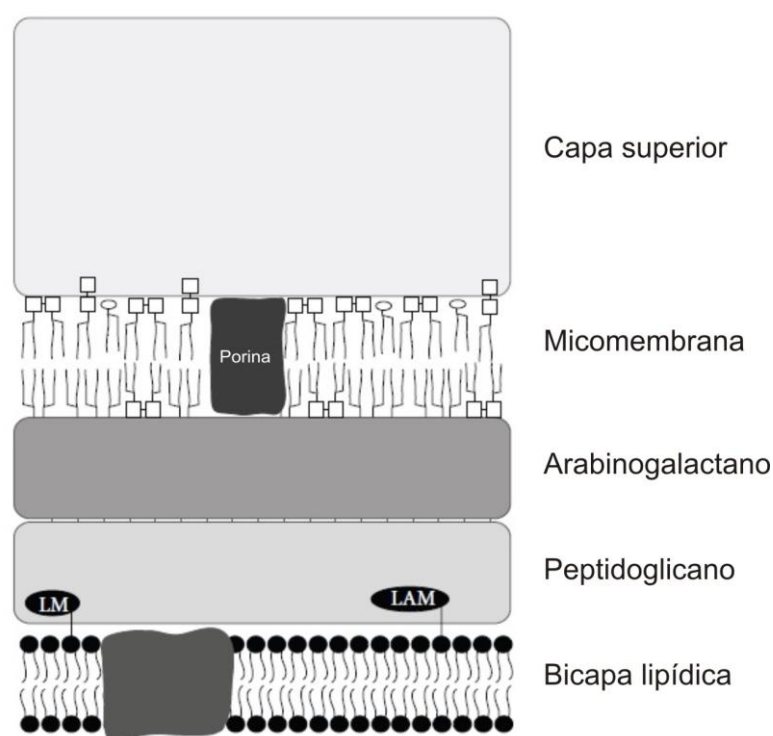


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *Corynebacteria*. Las diferentes capas se encuentran en todas las especies, la distribución de algunos componentes como liponnanos y lipoarabinomananos así como la presencia de distintas porinas puede variar. La capa superior, presente en *C. glutamicum*, se encuentra compuesta principalmente por la proteína PS2 [12].

Corynebacterium como modelo de organismo productor de compuestos de interés industrial

Aminoácidos

El proceso de producción de glutamato utilizando *C. glutamicum* es actualmente una tecnología ampliamente estudiada y desarrollada desde hace décadas [15, 16]. Bajo condiciones estándares el glutamato es producido por la enzima glutamato deshidrogenasa utilizando como precursor el 2-oxoglutarato [17]. La productividad típica del proceso de obtención de glutamato a partir de cultivos de alta densidad es de 100 g/L luego de 2 días de proceso [18]. Para la producción industrial de este aminoácido, generalmente las fuentes de carbono suelen ser melazas de caña o remolacha, así como hidrolizados de almidón u otros azúcares [19, 20].

Tal como en el caso del glutamato, la producción biotecnológica de lisina es actualmente un proceso de rutina [16, 18, 21]. A diferencia del glutamato, la misma es utilizada en su mayoría como aditivo para los alimentos debido a su valor nutricional [20]. En Procesos de manufactura en gran escala de este aminoácido típicamente se alcanzan concentraciones de 160 g/L luego de 2 días [21]

Además a partir de distintas modificaciones en esta especie, también han sido desarrollados procesos para obtener otros aminoácidos de interés industrial como L-treonina [15]; L-fenilalanina [16]; L-triptofano y L-histidina [22]; L- arginina [23] y L- alanina [24] entre otros.

Ácidos orgánicos

El ácido láctico tiene numerosos usos en la industria alimenticia tanto para comidas como para bebidas [25]. Por otra parte el poli ácido láctico o PLA, es un polímero biodegradable con una gran resistencia a la tracción que se utiliza comúnmente para el envasado de alimentos. Uno de los mayores desafíos que se plantean en este momento, se enfoca en la producción industrial de ácido láctico no sólo desde glucosa, sino también a partir de almidón y materiales lignocelulósicos hidrolizados. De esta manera, desarrollar simultáneamente procesos productivos de compuestos de interés y la degradación de materiales de desecho de bajo costo [25]. Mediante procesos de Fed-batch pueden ser producidos hasta 95 g/L de ácido

L-láctico en 6 hs (43 g/L.h) logrando a concentraciones celulares de 60 gPS/L (gramos de peso seco por litro) [26].

Además del ácido láctico, otros ácidos orgánicos como el ácido succínico también han sido producidos exitosamente utilizando cultivos de *C. glutamicum* en fermentaciones de alta densidad [27]. El ácido succínico es actualmente producido a partir de petróleo y tiene un mercado potencial de 270.000 toneladas por año. El mismo sirve como materia prima para la obtención de diversos polímeros como γ -butyrolactona, tetrahydrofurano, 1,4-butanediol y pirrolidonas utilizados en las industrias de detergentes, surfactantes, alimenticia y farmacéutica [28-31]. En *C. glutamicum*, este compuesto también fue producido eficientemente reportándose concentraciones de hasta 146 g/L en 46hs de fermentación en condiciones llegando a densidades celulares de 50 gPS/L [32].

Combustibles: Etanol e Isobutanol

El etanol tiene aplicaciones en la industria del transporte y química, con un mercado potencial de billones de hectolitros anuales y actualmente es obtenido mediante destilación [33, 34].

C. glutamicum ha sido modificado genéticamente para producir etanol a partir de glucosa, así como de mezclas de hexosas y pentosas [35, 36]. Utilizando una cepa modificada de *C. glutamicum* R, se alcanzaron concentraciones de 78 g/L de etanol con rendimientos celulares 60 gPS/L y una productividad de 29,5 g/L.h [35].

Alcoholes de alto peso molecular como el isobutanol tienen grandes ventajas con respecto al etanol como ser su baja higroscopicidad, presión de vapor y corrosividad lo cual permite un manejo más seguro y eficiente [37]. Además el isobutanol puede servir como precursor para producción de isobuteno, el cual actualmente es producido a gran escala mediante el refinamiento del petróleo y es utilizado como aditivo para la gasolina y otros químicos especiales [38]. Mediante cepas modificadas con deleciones en los genes de la piruvato deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa, fue posible obtener en esta especie un rendimiento de 0,2 g de isobutanol/g glucosa luego de 40 h de proceso [39].

Figura 3

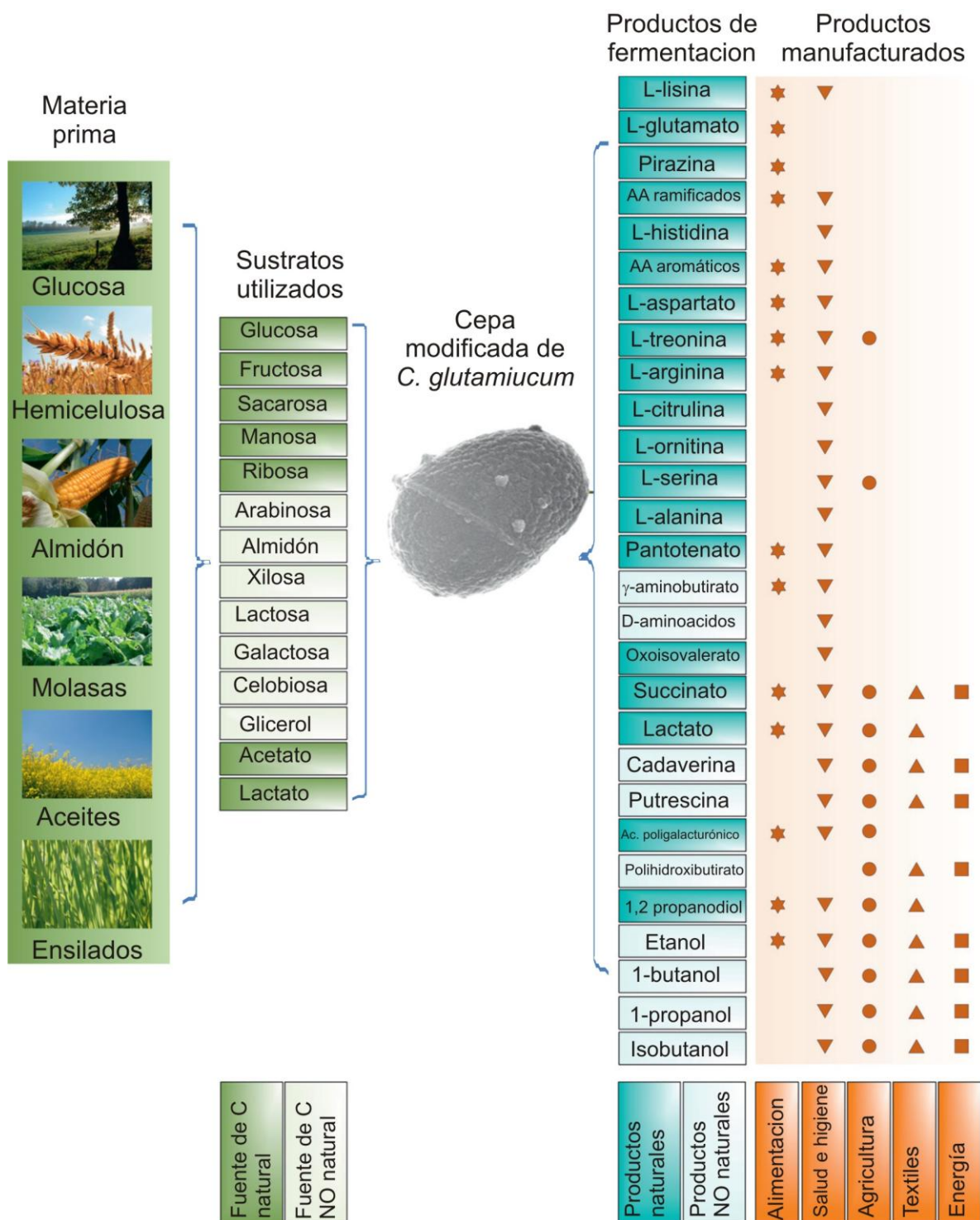


Figura 3. Productos de consumo humano obtenidos a partir procesos fermentativos de *C. glutamicum* alimentados con materias primas renovables [40].

Sistemas de producción de proteínas recombinantes

La producción de proteínas recombinantes requiere de procesos integrados que incluyen sortear desafíos que van desde la biología molecular hasta el proceso de purificación y formulación (o downstream). Generalmente el huésped elegido tiene un rol principal ya que muchas de características del producto así como las técnicas de ingeniería genética y las estrategias de recuperación van a depender de las capacidades del organismo productor. Actualmente hay una gran variedad de hospedadores disponibles incluyendo bacterias, levaduras o células animales y la elección del mismo depende de muchos factores. La velocidad de producción, rendimiento, funcionalidad y calidad de la enzima son generalmente prioritarios. Sin embargo, al momento de la selección del hospedador, prevalece la alternativa que facilite desarrollar procesos simples, que permitan obtener un producto recombinante con la calidad requerida [41].

A continuación se detallan las características de los principales sistemas de expresión de proteínas heterólogas.

Sistemas de expresión bacterianos

Escherichia coli

E. coli fue el primer organismo utilizado para la producción de proteínas recombinantes humanas y en la actualidad es uno de los organismos más utilizados para la expresión de proteínas heterólogas. Una de las razones principales es que esta especie es una de las más estudiadas y se ha generado una gran cantidad de conocimientos acerca de su fisiología, bioquímica y genética [42-44].

Esta bacteria es fácil de cultivar y manipular genéticamente. Es capaz de crecer hasta altas densidades celulares en fermentadores (hasta 175 gPS/L) y tiene necesidades nutricionales simples que pueden ser suplidas con medios definidos y muy económicos [45]. A nivel de síntesis de proteínas es un organismo rápido, de alto rendimiento y puede acumular proteínas recombinantes en una proporción que puede llegar hasta el 80% de su peso seco. Es por esta razón que *E. coli* es generalmente la primera opción al momento de la elección de un sistema de expresión [41].

Sin embargo *E. coli* presenta una serie de desventajas al momento de producir proteínas de gran tamaño o complejas provenientes de organismos eucariotas. La misma, no es capaz de realizar modificaciones post traduccionales como glicosilaciones o acilaciones. Además, su capacidad de realizar plegamientos complejos que incluyen puentes disulfuro o activaciones proteolíticas como los organismos superiores es bastante limitada [46]. Por otro lado, al momento de obtener proteínas de uso terapéutico una desventaja es la acumulación del lipopolisacárido, generalmente referido como endotoxina, el cual resulta pirogénico en humanos y otros mamíferos. Las proteínas utilizadas con este fin deben ser purificadas en un segundo paso para eliminar este compuesto, lo cual genera un incremento del costo de producción [47]. Más allá de este inconveniente, varias cepas no patogénicas de *E. coli* de uso común como la BL21 y K12 son consideradas inocuas o GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA (administración de drogas y comidas de Estados Unidos). Por último, otra deficiencia de la sobreexpresión en este sistema es que muchas proteínas forman agregados citoplasmáticos insolubles en el citoplasma denominados cuerpos de inclusión. Las proteínas que los conforman generalmente se encuentran inactivas, están parcialmente plegadas y además suelen mostrar artefactos estructurales como puentes disulfuro no nativos, tanto intra como intermoleculares [48]. Diversas estrategias pueden ser utilizadas para evitar la formación de estos agregados como el cultivo a menor temperatura, la co-expresión de chaperones moleculares, fusiones de proteínas o sustitución de aminoácidos mediante ingeniería genética [49].

Bacillus subtilis

Después de *E. coli*, diferentes cepas del género *Bacillus*, en particular *B. subtilis*, se encuentran entre los huéspedes más populares para la producción de proteínas heterólogas. Esta especie ha sido utilizado industrialmente desde hace décadas y de hecho, muchas proteínas de relevancia farmacéutica son obtenidas a partir de esta especie [50-53]. Una de las características más importantes es la capacidad natural de secretar eficientemente proteínas al medio extracelular, simplificando los pasos de purificación y eliminando la necesidad de ruptura celular o tratamientos químicos que incrementan los costos de producción [54]. *B. subtilis* también es considerado GRAS y al igual que *E. coli* tiene requerimientos

nutricionales sencillos, no presenta dificultades para cultivarlo y es capaz de crecer rápidamente hasta lograr altas densidades celulares en procesos de fermentación [41]. Sin embargo, los rendimientos pueden llegar a verse afectados negativamente debido a la actividad de proteasas endógenas. De hecho una de estas proteasas, la subtilisina, es producida industrialmente como aditivo para los detergentes [55]. Actualmente, ya se encuentran disponibles cepas deficientes en estas proteasas en las cuales las proteínas recombinantes obtenidas resultan mucho más estables [56, 57]. Otra característica que puede afectar el rendimiento en la producción es la esporulación ante situaciones de estrés. Aunque también existen mutantes aporogénicas, esta acción también puede ser evitada simplemente modificando la composición del medio [58, 59]. Por último, aunque su genoma se encuentra secuenciado y la manipulación genética es sencilla, una desventaja es que los plásmidos no suelen ser muy estables, siendo la integración cromosómica la única opción para obtener cepas recombinantes estables [55]. En la actualidad diferencia de *E. coli* no se conoce mucho acerca de su capacidad de generar puentes disulfuro en los productos obtenidos [60].

Sistemas de expresión en levaduras

Pichia pastoris* y *Sacharomices cerevisiae

Las levaduras son uno de los huéspedes alternativos favoritos para la expresión de proteínas heterólogas complejas tanto con fines académicos así como industriales y farmacéuticos.

Las especies más utilizadas son *P. pastoris* y *S. cerevisiae* las cuales se encuentran genéticamente bien caracterizadas, siendo la ventaja principal del uso de este sistema, la posibilidad de realizar modificaciones post traduccionales como formación de puentes disulfuro, procesamiento proteolítico y glicosilaciones. Las glicosilaciones tienen gran importancia debido a su influencia sobre la cinética de reacción, solubilidad, vida media, estabilidad térmica, actividad, inmunogenicidad y capacidad de unión a receptores [61, 62]. Ambas especies tienen una larga historia en la producción de enzimas recombinantes, son consideradas GRAS y a diferencia de las células de insecto o mamíferos, tienen como ventaja una rápida tasa de duplicación celular (horas). Para las mismas están reportadas densidades celulares superiores a 100 gPS/L mediante el uso de medios mínimos y muy económicos

comparados con los utilizados en las líneas celulares [63]. Por último una de las principales particularidades de este tipo de sistemas es la capacidad de secretar proteínas de manera eficiente y la posibilidad de obtener cepas estables tanto por integración como mediante el uso de plásmidos de localización nuclear de alto número de copias [64].

Aunque *S. cerevisiae* es capaz de realizar glicosilaciones, en muchos casos no son compatibles con la funcionalidad de proteínas de mamíferos. Los oligosacáridos incorporados a residuos de serina o treonina ("O-linked"), en las proteínas producidas por esta especie, contienen sólo residuos de manosa mientras que los eucariotas superiores presentan cadenas con ácido siálico. Otro defecto de este sistema, es la hiper glicosilación con moléculas de manosa de los residuos de asparagina ("N-linked"), llevando a una reducción tanto en la actividad como en la capacidad de unión del ligando a los receptores [65]. Más allá de estos inconvenientes, en la actualidad varios productos comercializados como la insulina, glucagón y factor estimulante de macrófagos son obtenidos a partir de cepas modificadas de *S. cerevisiae* [41].

P. pastoris es una levadura metilotrófica capaz de utilizar metanol como única fuente de carbono y energía. Una de las razones principales para la elección de este organismo como sistema de expresión, es el uso de promotores muy fuertes y estrictamente regulados para la producción de proteínas recombinantes como es el AOX1 [64]. Este promotor es naturalmente responsable de la producción de una alcohol oxidasa capaz de metabolizar el metanol y convertirlo en material celular en condiciones aerobias. El promotor AOX1 se encuentra fuertemente reprimido en presencia de otras fuentes de carbono como glucosa o glicerol, pero es inducido hasta mil veces en presencia de metanol como única fuente de carbono. Esta posibilidad de control es una ventaja al momento de expresar proteínas que pueden resultar tóxicas para las células. Más allá de estas características la principal desventaja, aunque no resulta prohibitiva, es la necesidad de contar con la infraestructura necesaria para manejar grandes cantidad de metanol en forma segura ya que el mismo es tóxico e inflamable. Como alternativa, existe la posibilidad de utilizar promotores como el GAP para el control de la expresión de proteínas heterólogas. Este promotor, responsable de la producción de la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa, es constitutivo y ha facilitado el desarrollo

de procesos eficientes de producción mediante el uso de fuentes de carbono inocuas como glucosa o glicerol [66-68].

Otra cualidad sobresaliente de *P. pastoris* por sobre otras levaduras, es que fisiológicamente prefiere crecer mediante un metabolismo respiratorio que sobre uno fermentativo. Productos de como el etanol y ácido acético, llegan rápidamente a concentraciones tóxicas en ambientes de alta densidad celular para organismos que prefieren realizar fermentación [64].

Al momento de compararla con *S. cerevisiae*, *P. pastoris* presenta algunas ventajas como organismos productor. Entre ellas se destacan las mayores productividades en la obtención de proteínas heterólogas y la posibilidad de crecer en metanol como única fuente de carbono la cual evita la contaminación por otros microorganismos en cultivos de alta densidad [41]. Por otro, lado la capacidad glicosilación en esta especie es mucho menos extensiva, debido a que es capaz de polimerizar cadenas mucho más cortas de oligosacáridos. Esta levadura puede incorporar hasta 20 residuos de manosa, mientras que *S. cerevisiae* agrega hasta 150. Por otro lado *P. pastoris* carece de la enzima 1,3 manosil transferasa, que incorpora residuos terminales de manosa (unidos mediante enlaces α -1,3) que pueden causar una respuesta una antigénica severa [69]. Para solucionar estas diferencias, ya se han desarrollado cepas modificadas capaces de realizar patrones de glicosilación similares a las células animales, obteniendo proteínas totalmente funcionales [70]. Como desventaja se puede mencionar que esta especie carece de chaperonas que en muchos casos son necesarias para lograr el correcto plegamiento de proteínas complejas. Este conjunto de cualidades ha permitido manufacturar muchos productos de gran importancia comercializados en el mercado mundial, tales como como la vacuna de la hepatitis B o albúmina sérica humana, a partir de cultivos de *P. pastoris* [71].

Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos, como *Aspergillus niger*, también resultan huéspedes atractivos debido a su habilidad de secretar grandes cantidades de proteínas [41]. Las fermentaciones a gran escala de hongos filamentosos han sido realizadas desde la primera mitad del siglo XX, mayormente para la producción de antibióticos. En particular, especies como *A. niger* son considerada GRAS y

utilizadas industrialmente para la producción de muchas sustancias como ácido cítrico y ácido glucónico además de enzimas recombinantes [72].

Aunque muchas cepas mejoradas de hongos han sido obtenidas mediante técnicas clásicas como la exposición a agentes mutagénicos y posterior selección, actualmente se encuentran disponibles las secuencias de los genomas de varias especies, facilitando la posibilidad de utilizar otro tipo de herramientas para realizar ingeniería genética [73-75]. Mediante integraciones en el cromosoma, a través de plásmidos que son incorporados como repeticiones en tándem, se han logrado obtener cepas estables que contienen hasta 100 copias de los genes a expresar [76].

En la actualidad, todo tipo de proteínas son obtenidas y secretadas a partir hongos filamentosos reportando en algunos casos rendimientos superiores a los 30 g/L. Entre los ejemplos más comunes se pueden encontrar casos de gran interés industrial como la quimosina, lactoferrina humana, anticuerpos, proteasas alcalinas y amilasas [73, 77, 78]. Una gran ventaja que presenta este sistema de expresión es la enorme flexibilidad nutricional y facilidad con la que pueden ser cultivados en todo tipo de medios, desde líquidos hasta sólidos, utilizando desechos industriales como sustrato [79-81]. Al igual que las levaduras, las proteínas producidas por los hongos, son glicosiladas eficientemente incorporando residuos de manosa en las cadenas de oligosacáridos. Sin embargo a diferencia *S. cerevisiae* no se observa la hiper glicosilación de residuos que puede tener como consecuencia la pérdida de actividad o estabilidad. Por otro lado, con el fin de obtener proteínas con fines farmacéuticos, ya se han desarrollado cepas que expresan glicosil transferasas capaces de realizar modificaciones similares a las células de mamíferos [82, 83].

Como desventaja acerca de la utilización de este microorganismo, se puede mencionar que aunque son capaces de secretar enormes cantidades de proteínas homólogas, la eficiencia puede verse seriamente afectada al momento de utilizarlo para la producción de proteínas heterólogas. Esta diferencia se debe puede deberse mayormente a la producción de proteasas, procesamiento incorrecto o inestabilidad de ARN mensajero de genes exógenos [84].

Células de mamíferos

Los sistemas de expresión de células de mamíferos son utilizados para la producción de proteínas que requieren modificaciones post traduccionales específicas. El uso de células de mamíferos, concretamente de células de ovario de hámster chino (CHO), comenzó en los primeros tiempos de la biofarmacéutica en la década del 80. En esta época, existió la necesidad de obtener productos glicosilados como eritropoyetina y activador tisular de plasminógeno los cuales no podían ser producidos en los hospedadores más comunes como *E. coli*. Desde entonces, las células CHO se han constituido como los sistemas preferidos para la producción de anticuerpos monoclonales y otras proteínas recombinantes complejas [41]. Posteriormente también se desarrollaron otro tipos de células como las de mieloma de ratón (NS0), riñón de hámster o simio (BHK) para la producción de diversas vacunas como es el caso de la poliomelitis [44]. Las células de mamíferos son particularmente útiles no sólo para la obtención de productos glicosilados, sino también correctamente plegados; eliminando de esta manera la necesidad de renaturalizarlos en pasos posteriores. Por otro lado también son capaces de realizar diversas modificaciones post traduccionales como el agregado de cadenas de ácidos grasos y fosforilación residuos hidroxilos de tirosina, treonina y serina.

Entre las desventajas más importantes que presentan estos sistemas se puede mencionar la escasa capacidad de secreción y productividad. En los primeros años, la productividad en líneas celulares estables derivadas de las CHO era de 10 pg/célula.día, con títulos de 50 mg/L, en procesos que duraban hasta una semana. Sin embargo para la última década estos números han mejorado consistentemente a valores de 90 pg/célula.día logrando rendimientos de 5 g/L en procesos extendidos de varias semanas de duración [85]. Este sustancial aumento es resultado de muchos años de investigación en el que se ha conseguido un mejor entendimiento de los procesos de expresión de genes, apoptosis, metabolismo y crecimiento celular. En este sentido, se han desarrollado líneas celulares con mayor viabilidad y altas productividades específicas así como medios de cultivos que facilitan cultivos de altas densidades celulares permitiendo lograr rendimientos más que satisfactorios, haciendo que en la actualidad la recuperación y purificación se conviertan en los nuevos desafíos [86].

Por otro lado, un inconveniente de este sistema de expresión suele ser que las células animales requieren hormonas y factores de crecimiento los cuales encarecen significativamente los medios de cultivo. Inicialmente, para cubrir estas necesidades nutricionales, los mismos se encontraban suplementados con suero bovino. Sin embargo ante la posible contaminación del producto final con virus o priones muy difíciles de eliminar, se han desarrollado medios ricos libres de suero. Los mismos contienen hidrolizados proteicos, de plantas o animales, y son suplementados con diferentes factores al momento de ser utilizados para la producción a gran escala [87, 88].

Durante el escalado de los procesos productivos, la fragilidad que presentan las células animales puede resultar una de las cuestiones más importantes a tener en cuenta. Tanto la agitación como la aireación son los aspectos más críticos y los que presentan las mayores dificultades. En este sentido, hay un gran trabajo realizado en el campo del diseño de biorreactores contemplando factores como la velocidad y fuerza de corte de la hélice para evitar problemas asociados al daño celular, así como la transferencia de masa en la superficie gas-líquido [89, 90].

Desafortunadamente, la obtención de líneas celulares recombinantes estables todavía es una tarea que requiere mucho tiempo y esfuerzo. Los caminos tradicionales para modificar genéticamente células de mamíferos, están basados en la sobreexpresión de genes endógenos cuyos niveles normales son muy bajos. Los métodos de ingeniería más comunes consisten en obtener un ADN copia del gen que va a ser expresado y clonarlo en vectores virales los cuales son transfectados para generar líneas celulares recombinantes. Este procedimiento no se encuentra restringido sólo a genes endógenos, sino también es factible para la sobreexpresión de genes heterólogos [91]. Una vez en transfectados, ocurre una integración al azar de estos vectores en el genoma, la cual es promovida por la presión de selección o utilizando alguna auxotrofia.

Más allá de que las modificaciones mediante el uso de vectores virales faciliten una forma sencilla de realizar integraciones, tiene como desventaja que las mismas no son dirigidas específicamente a un sitio del genoma de las células. El lugar de integración puede tener una gran influencia en los niveles de transcripción del gen recombinante [92]. Una integración en la heterocromatina puede hacer que el gen tenga muy poco o nada de transcripción, mientras que si este evento ocurre en la eucromatina activa generalmente la expresión se ve favorecida. Una de las

maneras para evitar los efectos de posición podría ser posible mediante una integración en regiones específicas a través de recombinación homóloga, sin embargo este fenómeno rara vez ocurre espontáneamente entre el ADN plasmídico y el genómico [93]. Como posible solución se ha descrito el uso de integrasas o recombinasas de fagos para aumentar las posibilidades de integraciones sitio específicas entre los distintos ADN [94]. Por otro lado en los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología denominada CRISPR/cas9 para editar precisamente genomas y desde el año 2014 se ha utilizado exitosamente con fines biotecnológicos para modificar células de CHO [95]. Este sistema se basa en el uso de una endonucleasa (Cas9) capaz de clivar el ADN en sitios específicos cuando es guiada por pequeñas moléculas de ARN. Luego mediante mecanismos de reparación celular o recombinación homóloga son introducidas las mutaciones deseadas [96].

Por último cabe mencionar que los tiempos necesarios para desarrollar una línea celular estable, así como el proceso de manufactura del producto deseado, suele demorar años y requerir inversiones de varios millones de dólares. Además, aunque no sólo ocurre para las proteínas obtenidas a partir de células de mamíferos, el proceso de introducción de un biofarmacéutico al mercado suele ser muy tedioso. debido a la gran cantidad de pruebas necesarias para obtener una aprobación de los organismos reguladores [97]. Sin embargo, más allá de estas complicaciones desde la primera aprobación hasta el año 2011, se han aprobado más de 96 proteínas recombinantes de uso terapéutico producidas en sistemas de células de mamíferos produciendo ganancias que superan los 100 billones de dólares [98].

Ventajas de *C. glutamicum* para la producción de compuestos de interés industrial

C. glutamicum exhibe numerosas propiedades y atributos intrínsecos, para la producción de metabolitos primarios y secundarios, los cuales pueden resultar determinantes al momento de desarrollar procesos de manufactura económicamente viables [2].

Entre las cualidades más importantes se puede mencionar que tiene una buena aceptación pública y regulatoria, ya que se encuentra aprobado por la FDA, siendo considerado como GRAS [15, 99]. Por otro lado, también cumple con una de

las características más buscadas en un proceso industrial como es la reproducibilidad y estabilidad de las cepas productoras. En este sentido *C. glutamicum* es un candidato más que atractivo debido a la ausencia de un sistema de reparación por recombinación y a la presencia de un sistema de modificación por restricción limitado [100, 101]. A raíz de esto, se destaca otra propiedad importante en esta especie, como ser la facilidad de realizar manipulaciones genéticas para desarrollar cepas que expresen proteínas heterólogas. Para ello se encuentran disponibles una gran variedad herramientas entre las que se incluyen tanto plásmidos estables, integrativos y replicativos, como promotores bien caracterizados los cuales pueden ser regulables o constitutivos según sea necesario [102-105].

Entre los atributos para los procesos industriales, se destacan la presencia de una pared celular robusta, la cual confiere resistencia a la fuerza de corte generadas por las paletas de los biorreactores y una gran versatilidad para utilizar como fuente de carbono concomitantemente diferentes hexosas y pentosas, así como materias primas de desecho [36, 99, 106, 107]. En condiciones aerobias *C. glutamicum* es capaz de lograr densidades celulares relativamente altas (65 gPS/L) tanto en medios sencillos mínimos como semi definidos [108]. Por otro lado debido a sus características como anaerobio facultativo, también resulta posible conducir las fermentaciones en condiciones de privación de oxígeno, reduciendo de esta manera el calor producido durante el metabolismo y por lo tanto los costos debido al consumo de energía requerido sistemas de enfriamiento [35, 108, 109]

Entre las características más sobresalientes para el desarrollo de procesos de producción de proteínas recombinantes se pueden mencionar que es una especie Gram positiva y por lo tanto no posee endotoxinas [5]. Además *C. glutamicum* presenta mecanismos eficientes de secreción de proteínas (Sec y Tat), secreta una pequeña cantidad de proteínas endógenas y no tiene actividad proteasa de amplio espectro en el sobrenadante simplificando de esta manera los procesos purificación [110-112]. Por último a diferencia de otros Gram positivos como *B. subtilis*, es capaz de realizar glicosilaciones, lo cual permite considerar a esta especie al momento de producir proteínas que requieran modificaciones post traduccionales [113].

Producción de enzimas recombinantes en *C. glutamicum*

Aunque los microorganismos favoritos para la obtención de enzimas recombinantes son mayormente *E. coli*, *B. subtilis*, *P. pastoris* y hongos, la producción de proteínas en *C. glutamicum* ya fue reportada desde hace más de dos décadas. Esto ha dado un indicio de que esta especie también podría resultar atractiva como productora de enzimas recombinantes a escalas industriales [114].

C. glutamicum presenta muchas características que lo hacen un microorganismo más que interesante para el desarrollo de procesos de manufactura de enzimas recombinantes. Además de proporcionar una plataforma tecnológica flexible para la producción de diversos compuestos, como fue mencionado previamente, brinda la posibilidad de secretar proteínas de forma eficiente mediante diferentes vías y carece de actividad proteasa extracelular. Sin embargo, a pesar de poseer estas importantes ventajas para el desarrollo de un sistema de expresión eficiente y económico, sólo en muy pocos casos se obtuvo una productividad lo suficientemente alta como para que el escalado del proceso sea económicamente viable para la producción industrial [115, 116]. Es por ello, que todavía hay mucho trabajo por realizar con el fin de optimizar rendimientos en los procesos de producción de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*.

Como se puede observar en la Tabla 1, la enzima GFP es la que presentó los valores más altos de productividad entre los ejemplos de proteínas recombinantes secretadas en esta especie. Sin embargo, de todos los casos descritos sólo la producción de transglutaminasa derivó en un proceso productivo que actualmente es explotado a nivel industrial [117].

Tabla 1

| Cepa | Enzima | Origen | Rendimiento | Via de secreción | Referencia |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|--------------|------------------|------------|
| <i>C. glutamicum</i> R | GFP | <i>Aequorea victoria</i> | 2.8 g/L | Tat | [118] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 | Camelid antibody fragment (VHH) | Synthetic | 1.57 g/L | Sec | [119] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Glutaminasa | <i>Chryseobacterium proteolyticum</i> | 1.2 g/L | Tat | [120] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 | Endoxylanase | <i>Streptomyces coelicolor</i> | 1.070 g/L | Sec | [119] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Transglutaminasa | <i>Streptomyces mobarensis</i> | 881 mg/L | Sec | [116] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 | α -amylase | <i>Streptococcus bovis</i> | 782.6 mg/L | Sec | [119] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Glutaminasa | <i>Chryseobacterium proteolyticum</i> | 183 mg/L | Tat | [121] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Celulasa | <i>Streptomyces halstedii</i> | 5 units/mL | Sec | [122] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Xilanasa | <i>Streptomyces halstedii</i> | 20 units/mL | Sec | [122] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13869 | Factor de crecimiento epidérmico | Humano | 156 mg/L | Sec | [110] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13059 | Proteasa | <i>Dichelobacter nodosus</i> | 2.5 mg/mL | Sec | [123] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13059 | Subtilisina | <i>Bacillus subtilis</i> | 0.5 mg/mL | Sec | [123] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13059 | Nucleasa | <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 mg/L | Sec | [124] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 | α -amilasa | <i>Streptococcus bovis</i> | 0.6 units/mL | Sec | [125] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 | GFP | <i>Aequorea victoria</i> | NQ | Tat | [126] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 17965 | Antígeno 85A | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | NQ | Sec | [127] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 21798 | Endoglucanasa | <i>Cellulomonas fimi</i> | 35 units/mL | Sec | [114] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 21798 | Exdoglucanasa | <i>Cellulomonas fimi</i> | 0.3 units/mg | Sec | [114] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 21798 | X22 xilanasa | <i>Aspergillus nidulans</i> | 6 units/mL | Sec | [128] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 21798 | Endo-1,4 b-xilanasa | <i>Streptomyces halstedii</i> | 22 units/mL | Sec | [129] |
| <i>C. glutamicum</i> ATCC 21798 | α -amilasa | <i>Streptomyces griseus</i> | NQ | Sec | [130] |
| <i>C. glutamicum</i> R | α -amilasa | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | 0.3 units/mL | Tat | [131] |
| <i>C. glutamicum</i> R | α -amilasa | <i>Geobacillus stearothermophilus</i> | 0.1 units/mL | Sec | [131] |

Tabla 1. Ejemplos de proteínas recombinantes producidas en *C. glutamicum* [2].

Biología sintética

Desde hace varios años, nuevos desarrollos tecnológicos han permitido que el ADN pueda ser sintetizado en forma eficiente y económica. Por otra parte, las secuencias de ADN pueden obtenerse más fácilmente en forma digital que en forma

física ya que las mismas se encuentran disponibles en diversas bases de datos. Debido a estos adelantos tecnológicos, el uso de ADN sintético se ha expandido rápidamente en los últimos años para constituirse en el pilar fundamental de una nueva disciplina denominada “biología sintética” [132, 133].

La biología sintética es una disciplina emergente que tiene como objetivo crear organismos nuevos con circuitos genéticos de diseño. Generalmente, dichos circuitos están contruidos a partir de “partes biológicas estándares” conocidos como Biobricks, las cuales en la mayoría de los casos provienen de la naturaleza. La facilidad de acceso a las secuencias así como la posibilidad de realizar síntesis personalizada, ha dado lugar a un aumento significativo de la disponibilidad de Biobricks así como de sus variantes no naturales [134]. Por otra parte, las tecnologías de síntesis de ADN actuales han permitido construir bibliotecas de diversas partes biológicas como promotores, operadores, sitios de unión a ribosomas (RBS) y marcos abiertos de lectura (ORF). Los mismos pueden ser ensamblados en circuitos genéticos, vías metabólicas o genomas completos agilizando de esta manera la obtención de combinaciones en la búsqueda de posibles nuevas funciones (Figura 4) [135]. En este sentido, la biología sintética contribuye fuertemente al avance de la ingeniería metabólica reduciendo los tiempos de desarrollo de organismos genéticamente modificados como resultado de la utilización de Biobricks con respuestas predecibles. De esta manera, el progreso realizado en este campo permite no sólo el diseño y la obtención de organismos capaces de producir novedosos compuestos sino también la optimización de los rendimientos de producción existentes, generando como consecuencia una disminución en los costos de procesos industriales [136, 137].

Figura 4

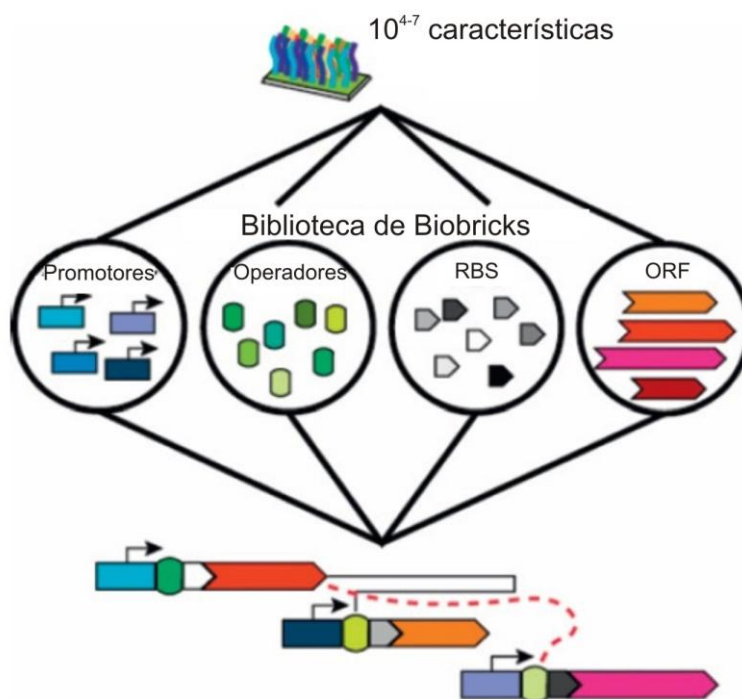


Figura 4. Esquema representativo de las múltiples combinaciones posibles resultantes de combinar bibliotecas de Biobricks [135].

Biología sintética en *C. glutamicum*

Más allá de que exista una larga historia en la producción de compuestos en *C. glutamicum*, la mayoría de las cepas modificadas fueron obtenidas durante muchos años mediante métodos clásicos realizando múltiples rondas de mutagénesis al azar y selección [138]. El desarrollo de herramientas de biología sintética para la modificación de esta especie fue realizado en su mayoría en los últimos cinco años [139].

La capacidad de modular la expresión génica resulta una herramienta importante para producir proteínas recombinantes. Para ello, varios autores trabajaron en la obtención de bibliotecas de promotores sintéticos para *C. glutamicum*. Los promotores obtenidos, tanto constitutivos como inducibles, presentaron un amplio rango de actividades para la expresión del gen reportero de la β -galactosidasa. Para la construcción de los promotores constitutivos, se basaron en secuencias -10 consenso encontradas frecuentemente en *C. glutamicum* y en

regiones -35 consenso de promotores de *E. coli*. Los promotores inducibles fueron sintetizados utilizando como base las regiones -10 y -35 de promotor *lac* de *E. coli*. A partir de los mismos se modificaron al azar bases tanto en la región espaciadora entre el -10 y -35 como por fuera de la misma [140]. Con el mismo objetivo, otro grupo también obtuvo una biblioteca de promotores sintéticos para esta especie pero con un concepto distinto. En este caso se modificaron aleatoriamente las 70 bases anteriores al sitio de inicio de la traducción del gen reportero, en este caso la proteína fluorescente verde GFP, sin incluir el sitio de unión a ribosomas. De todas las combinaciones obtenidas, los seis promotores con mayor fuerza fueron seleccionados para la expresión de proteínas de interés industrial tales como xilanasa y fragmentos de anticuerpos [141].

Desgomado enzimático de aceites

Los aceites vegetales crudos, obtenidos por prensado o extracción con solventes son una mezcla compleja compuesta por triacilglicerol, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, ácidos grasos libres, trazas metálicas y otros compuestos menores. Los aceites vegetales deben ser refinados para ser aptos para el consumo en alimentos o para aplicaciones tales como la generación de biodiesel. Para ello, deben removerse los fosfolípidos, los ácidos grasos libres y las trazas metálicas.

El contenido de fosfolípidos en aceite se mide como “contenido de fosfato” (P) y se expresa en ppm. El objetivo del refinamiento es la obtención de un aceite con menos de 5 ppm de P, siendo que los contenidos iniciales en aceites crudos son de 400-1200 ppm para el aceite de soja y 300-700 ppm para el de girasol.

De la totalidad de los diferentes fosfolípidos presentes en el aceite crudo de soja la fosfatidilcolina (PC) tiene la fracción mayoritaria representando un 47%. Luego el resto de la mezcla está formado por fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y ácido fosfatídico (PA) los cuales representan un 24%, 20% y 9% respectivamente. Los fosfolípidos con grupos funcionales como la colina y etanolamina tienen la mayor afinidad por el agua, mientras que el inositol, el ácido fosfatídico y las sales del mismo (Ca, Mg y Fe) tienen menor afinidad por el agua y son conocidos como fosfolípidos no hidratables o NHFs. La hidratación de los fosfolípidos produce la formación de una emulsión con aspecto de “gomas” que puede ser separada por centrifugación. Los fosfolípidos pueden ser parcialmente o

completamente removidos del aceite vegetal utilizando diferentes métodos tales como: desgomado por agua [142], tratamiento con ácido [143] o desgomado enzimático [144, 145].

El desgomado por agua se aplica a los aceites crudos con alto contenido de fosfolípidos hidratables [142]. El aceite se mezcla con 1-5% de agua a 60-75°C con agitación durante 15-60 minutos. Es un tratamiento suave que permite utilizar los fosfolípidos obtenidos como lecitinas que se destinan a múltiples usos, tanto alimenticios como industriales. El aceite resultante contiene aún alrededor de 200 ppm de P, principalmente fosfolípidos no hidratables que deben removerse en operaciones subsecuentes. La desventaja de este proceso es que las gomas eliminadas “capturan” las moléculas de triacilgliceroles (TAGs), llegando a contener hasta un 20 % de aceite, que no puede separarse físicamente o ser recuperado de la emulsión representando una pérdida significativa del proceso.

El desgomado ácido se aplica al aceite crudo o previamente desgomado con agua y logra la remoción total de los fosfolípidos [143]. El aceite se mezcla con ácido fosfórico o cítrico a 60-90°C con agitación. El ácido reacciona con las sales de los NHFs aumentando así su naturaleza hidrofílica y por lo tanto mejorando su remoción. Al igual que en desgomado con agua hay una pérdida importante de aceite en la separación de las gomas. Las gomas obtenidas de este proceso ya no pueden usarse como lecitinas para alimentación, constituyendo un desecho problemático para los refinadores. Si bien este material puede tratarse y recuperar para usos no alimenticios o bien venderse como tal, la operación es siempre problemática porque el material se degrada rápidamente y no es posible almacenarlo por largo tiempo.

El proceso de desgomado enzimático utiliza fosfolipasas para hidrolizar los fosfolípidos generando diacilglicéridos (DAGs) y productos solubles en agua facilitando de esta forma la remoción de los mismos con lavado [144, 145]. La utilización de este proceso supone un aumento en el rendimiento de la refinación (extra yield), no sólo por la eliminación de los fosfolípidos que capturan las moléculas de TAGs, sino también por la generación de los DAGs que son recuperados en la fase oleosa. El desgomado enzimático fue reportado por primera vez en 1990 con el nombre de proceso Enzymax [144, 146] y fue posteriormente explorado mediante el uso de fosfolipasas de diferentes orígenes. Hasta el momento solo cuatro enzimas se han utilizado a nivel industrial: PLA2 de páncreas porcino (EnzyMax®), PLA1 de

Fusarium oxysporum (Lecitase® Novo, de Novozymes) [147], PLA1 de *Thermomyces lanuginosus*/*Fusarium oxysporum* (Lecitase® Ultra de Novozymes) [148] y PLC aislada de una biblioteca ambiental (Purifine® de DSM) [149].

Las fosfolipasas pueden clasificarse de acuerdo a la posición del sitio de hidrólisis de la molécula sobre la que actúan, como PLA1, PLA2, PLB, PLC o PLD. Las posiciones de los enlaces éster sobre los cuales actúan estas diferentes fosfolipasas se grafican en la Figura 5. La reacción enzimática cambia la naturaleza del fosfolípido, las fosfolipasas A (PLA) catalizan la remoción de un ácido graso generando un lisofosfolípido más soluble en agua que su precursor. Por otro lado, la fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del grupo fosfato de la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, generando diacilglicerol soluble en el aceite y los grupos fosfatos hidrosolubles [149].

Figura 5

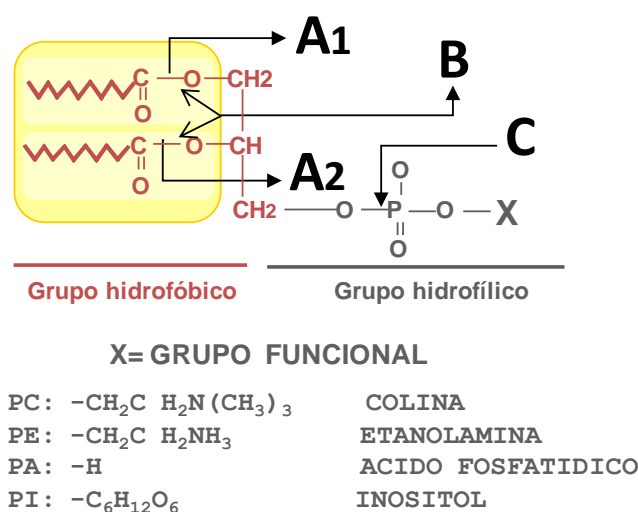


Figura 5. Esquema indicando las posiciones sobre las que actúan los distintos tipos de fosfolipasas: fosfolipasa A1 o A2 (PLA1, PLA2), fosfolipasa B (PLB) o fosfolipasa C (PLC).

Se ha propuesto un método que utiliza una combinación de fosfolipasas, PLA y PLC para mejorar la cinética de la hidrólisis y lograr la remoción completa de los fosfolípidos. Sin embargo, ha sido difícil establecer las condiciones óptimas de reacción para ambas enzimas durante el proceso [150].

El desgomado enzimático no genera efluentes o sub-productos conflictivos. Tiene como ventaja la no utilización de ácidos, con la menor corrosión que ello

conlleva en los equipos y la generación de efluentes amigables con el medio ambiente. A diferencia de los otros procesos, hay una reducción en la cantidad de desecho acuoso generado. La mayor desventaja de este proceso es la necesidad de emplear grandes volúmenes para la llevar a cabo la reacción enzimática. Dado que la enzima funciona en emulsiones agua-aceite, se requieren enormes cantidades de energía para mantenerlas mediante agitación a temperaturas elevadas. Esto trae aparejado además que, la estabilidad de la enzima durante el proceso en las condiciones de pH, contenido de agua y temperatura a las cuales se lleva a cabo el proceso cobra enorme importancia.

Las PLCs han sido aisladas de una gran variedad de especies como *Streptomyces*, *Clostridium* and *Bacillus* [151-153]. Particularmente PLC de *Bacillus cereus* (BC-PLC) ha recibido una atención considerable debido a su capacidad de hidrolizar eficientemente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. Dicha especificidad hace que esta enzima sea un candidato atractivo para ser utilizado en el proceso de desgomado enzimático de aceites consumibles a escala industrial [154-156]. La producción de esta enzima ya ha sido reportada en diversos organismos como *P. pastoris* y *B. subtilis*, sin embargo los rendimientos obtenidos no fueron suficientes como para establecer un proceso económicamente viable [157, 158]. Por otro lado cuando *E. coli* fue utilizado como organismo productor, esta proteína fue obtenida en forma de cuerpos de inclusión; lo cual deriva también en un proceso costoso debido a los múltiples pasos de purificación y grandes volúmenes requeridos para replegar la misma [159]. Es por esto que resulta deseable el desarrollo de un organismo capaz de producir grandes cantidades de BC-PLC a partir de un proceso robusto y rentable. En función de esto último, la producción de esta enzima tan relevante para la industria aceitera en un organismo con los atributos para la producción de proteínas heterólogas como *C. glutamicum*, resulta una estrategia más que interesante la cual es abordada en esta tesis doctoral.

Objetivos

Objetivos generales:

- El objetivo general de este proyecto es desarrollar mediante herramientas de biología sintética nuevas tecnologías que faciliten la producción de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*.

Objetivos específicos:

- Diseñar y desarrollar un vector de expresión con formato estándar aplicando conceptos de biología sintética
- Analizar en forma sistemática distintos elementos regulatorios involucrados en la biosíntesis de proteínas en *C. glutamicum*
- Ensayar la influencia de elementos no relacionados con la regulación de la expresión génica
- Analizar en forma sistemática distintas secuencias de secreción del sistema Tat reportadas para *C. glutamicum*
- Utilizar la plataforma pTGR para sobreexpresar los componentes del sistema Tat como múltiples unidades transcripcionales
- Aplicar el desarrollo realizado con la plataforma pTGR para expresar y secretar una Fosfolipasa C de *B. cereus* (BC-PLC)
- Realizar una caracterización funcional de la Fosfolipasa C recombinante producida en *C. glutamicum*
- Desarrollar un proceso de producción de BC-PLC utilizando una estrategia de Fed-batch mediante cultivos de alta densidad
- Ensayar la capacidad de la BC-PLC recombinante para el desgomado enzimático en experimentos a escala de laboratorio

Materiales y métodos

Cepas

La cepa de *C. glutamicum* utilizada en todo el trabajo fue la ATCC 13869 [160]. La cepa de *E. coli* utilizada para realizar los clonados fue DH5 α (*supE44 DlacU169* (f80 *lacZDM15*) *hsdR17 recA1 gyrA96 thi-1 relA1 supE44*, *hsdS20*(rB-mB-), *recA13*, *ara-14*, *proA2*, *lacY1*, *galk2*, *rpsL20*, *xyl-5*, *mtl-1*, *leuB6*, *thi-1*) [161].

Medios de cultivos

Los medios de utilizados para realizar cultivos en batch fueron para *E. coli* Luria Bertani (LB) el cual contiene 10,0 g/l de triptona, 5,0 g/l de extracto de levadura y 5,0 g/l de NaCl y para *C. glutamicum* infusión cerebro corazón con sorbitol (BHIS) el cual contiene 7,7 g/l de infusión de cerebro de vaca; 9,8 g/l de infusión de corazón de vaca 10 g/l de peptona; 2 g/l de D-glucosa; 5 g/l NaCl 5,0 2,5 g/l de Na₂H(PO₄) y 90 g/l de sorbitol. El medio semi-definido utilizado en los cultivos de alta densidad consistió en 9 g of K₂HPO₄, 4 g of KH₂PO₄, 2 g of urea, 10 g of (NH₄)₂SO₄, 2 g de extracto de levadura, 2 g of MgSO₄, 200 μ g of biotina, 5 mg of tiamina, 10 mg of FeSO₄, 1 mg of MnSO₄, 1 mg of ZnSO₄, 200 μ g of CuSO₄ y 10 mg of CaCl₂ por litro, suplementado con 10 g of glucosa. La concentración de Kanamicina fue de 50 μ g/mL para *E. coli* y 25 μ g/mL para *C. glutamicum*.

Genes sintéticos

Todos los genes utilizados en este trabajo fueron sintetizados por Genescript (NJ, USA).

Determinación del crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano fue determinado midiendo densidad óptica de los cultivos a 600 nm en un espectrofotómetro NovaspecIII de General Electric. Para determinar el peso seco se centrifugó 1 mL de cultivo a 13000 rpm durante 15 min, se lavaron las células sedimentadas con agua destilada y luego se secaron durante 12 h a 105°C antes de pesarse. Se determinó que 1 unidad de DO_{600nm} era equivalente a 0,2 gPS/L.

Transformación de *C. glutamicum*

La transformación de esta especie se realizó mediante electroporación. Para ello se agregó 1ul del plásmido a 50 ul de células competentes en cubetas de 2mm de ancho en frío. Luego se realizó el shock eléctrico a 25 μ F, 200 ohms y 2,5 kV y se resuspendió inmediatamente en medio BHIS precalentado a 46°C. Se incubó durante 6 minutos y luego se dejó recuperar 1 hora a 200 RPM a 30°C en agitación. Finalmente se plaqueó 100ul en BHIS agar 2% con el antibiótico correspondiente. Las placas se dejaron también a 30°C; generalmente en 48s aparecen las primeras transformantes.

Transformación de células competentes de *E. coli*

Células competentes de *E. coli* fueron transformadas con ADN plasmídico usando el procedimiento de cloruro de calcio descrito por Sambrook y colaboradores [162].

Geles de poliacrilamida

La electroforesis de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida monodimensionales utilizando equipos Miniprotean III (Bio-Rad). En todos los casos, la relación acrilamida: bisacrilamida utilizada en la preparación de los geles fue de 30:0,8. Las corridas electroforéticas fueron realizadas con una intensidad de corriente constante de 30 mA. Luego de la electroforesis, las proteínas fueron fijadas sumergiendo los geles en una solución de 10% (v/v) ácido acético durante 5 min y teñidas utilizando una solución de 1% (p/v) Azul de Coomassie R250 en etanol:ácido acético:agua (50:10:40). Las muestras proteicas fueron incubados en baño de ebullición, a 100°C o a 37°C durante 10 min en una solución de desnaturalización conteniendo 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glicerol, 0,1% (v/v) β -mercaptoetanol, 0,5 mg/mL de azul de bromofenol, y posteriormente sembrados en los geles.

Electroforesis de ácidos nucleicos

Las electroforesis de ADN en geles de agarosa se llevaron a cabo en sistemas de tipo submarino. La concentración de agarosa utilizada varió entre 0,7 y 2% (p/v) según el tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en solución TAE (40 mM Tris-Ac pH=8, 1 mM EDTA) y luego fueron teñidos con de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron en la misma solución, a un voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. Para la visualización del ADN se utilizó un transiluminador de luz UV (255 nm) Vilver Lourmat. Las muestras de ADN se sembraron utilizando solución de siembra (azul de bromofenol 0,25%, xilene cyanol FF 0,25%, glicerol 30%) en una proporción 6:1. Los tamaños de los fragmentos se estimaron utilizando como marcador Ladder 1Kb de New England Biolabs.

Digestión con endonucleasas de restricción

La digestión de ADN plasmídico con diferentes endonucleasas de restricción se realizó de acuerdo a las condiciones de reacción aconsejadas por los proveedores de las mencionadas enzimas. En general se incubó la mezcla de ADN (1-5 µg) y 10 unidades de cada una de las endonucleasas de restricción, en 50 µL de una solución tampón adecuada durante 2-3 h a 37°C.

Ligado de fragmentos de ADN

Las reacciones de ligación de fragmentos de ADN se llevaron a cabo utilizando la enzima T4 ADN ligasa en un volumen de 20 µl según las indicaciones del fabricante. En general se agregaron entre 50 y 500 ng de cada fragmento de ADN purificado a ligar y 1 unidad de ligasa en el buffer adecuado. La reacción se incubó a 17°C durante por lo menos 4 h.

Experimentos de expresión

Para determinar la expresión de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*, primero se realizó una dilución 1/50 partiendo de un cultivo saturado crecido a 30°C,

luego a esta dilución se dejó crecer durante 4 h (hasta una densidad óptica a 600nm aproximada igual a 1) y finalmente cuando fue necesario se le agregó el inductor IPTG.

Medida de fluorescencia y absorbancia de los cultivos

Para los ensayos *in vivo* de promotores y RBS, tanto la absorbancia a 600nm la fluorescencia de la eGFP a 509 nm fue medida con el lector de microplacas Biotek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader. Para los ensayos *in vivo* de operones y múltiples unidades transcripcionales, la fluorescencia de eGFP y mCherry fue determinada con el espectro fluorómetro Agilent Technologies Variant Cary Eclipse con el fin de determinar el aporte individual de cada proteína. En este último caso, la densidad óptica fue determinada a 600nm utilizando el espectro NovaspecIII de General Electric. Los valores de fluorescencia de ambas proteínas, fueron normalizados dividiendo el valor medido (en unidades arbitrarias) por el brillo correspondiente a cada una (34 1/(mM.cm) para eGFP y 16 1/(mM.cm) para mCherry) [163].

Cuantificación de la intensidad de las bandas de geles de poliacrilamida

La cuantificación densitométrica de los geles de poliacrilamida se realizó mediante el programa Gel pro analyzer 4.0 utilizando BSA como estándar.

Secuenciación de ADN

La secuenciación de las construcciones obtenidas fue realizada mediante el servicio de Macrogen (Korea).

Preparación plasmídica

Los plásmidos fueron extraídos de cultivos de *E. coli* mediante el kit de Axygen Biosciences Axy-Prep™ Plasmid Minipreps Kit.

Ensayo colorimétrico de actividad fosfolipasa

Para realizar este ensayo se utilizaron 10 μ l de diluciones de las preparaciones enzimáticas en 80 μ l de buffer Hepes 15mM, ZnSO₄ 1mM y 10% de glicerol. Luego se agregaron 10 μ l del sustrato cromogénico 4-nitrofenil fosforilcolina (PNOPC) 100mM y se dejó la reacción a 50°C durante 30 minutos. Finalmente se agregaron 700 μ l de Na₂CO₃ 0,2M para cortar la reacción y se midió la absorbancia a 405nm.

Ensayo colorimétrico para determinar los parámetros cinéticos de BC-PLC

Para realizar este ensayo se utilizaron 10 μ l de diluciones de las preparaciones enzimáticas en el mismo buffer que el apartado anterior pero se agregaron 10 μ l de PNOPC 10mM y se dejó la reacción a 50°C durante 60 minutos. Las diferentes reacciones se realizaron en microplaca de 96 pocillos y la absorbancia a 405 nm fue medida con el lector de Biotek Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader. PLC de *B. cereus* de Sigma fue utilizada como estándar. A partir de estos datos se utilizó la ecuación de Michaelis-Menten (Ecuación 1) para determinar los valores de K_m y V_{max} (Ecuación 1).

Ecuación 1
$$y = y^o + a (1 - e^{-b \cdot t})$$

Ecuación 1. Ecuación que ajusta la cinética de reacción de la BC-PLC. “y” es la medida de la absorbancia a 405nm en cada punto. “y^o” es la ordenada al origen, “a” es V_{max}/K_m , “t” es el tiempo de reacción.

Resonancia magnética nuclear de aceite crudo y tratado con PLC

Para realizar una RMN de los fosfolípidos remanentes, primero es necesario hacer una extracción de los mismos. Para ello, tanto el aceite tratado como el sin tratar con BC-PLC fue emulsionado utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T50 Homogenizer (IKA) durante 1 minuto. Luego se pesaron 300 mg de aceite, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se descartó todo el aceite posible quedándose con el pellet. Luego se agregaron 900 μ l de detergente RMN (100 mM Tris-HCl pH

10.5, 50 mM EDTA, 2.5% sodium deoxycholate), se agitó a 1400 rpm por 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y se removió la capa de aceite que se observa en la fase superior. Se tomaron 600 μ l de la fase acuosa inferior y se agregaron 500 μ l de hexano. Luego se volvió a centrifugar nuevamente a 13000 rpm durante 10 minutos. Finalmente se removió la fase orgánica superior, se tomaron 500 μ l de fase acuosa inferior y se agregaron 50 μ l de agua deuterada. El perfil de RMN de fosforo 31 fue realizado utilizando un resonador magnético Bruker 300 Ultrashield. Muestras de fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, ácido fosfatídico y fosfatidil inositol se utilizaron como estándares.

Introducción de mutaciones utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (crossover PCR)

Para obtener la construcción del pTGR29 la PLC de *B. cereus* fue amplificada por PCR utilizando los cebadores PLCBCF y PLCBCR3 (Tabla 2) a partir de ADN genómico de *B. cereus* ATCC 14579 como molde. Las construcciones de los plásmidos pTGR28 y pTGR30 fueron obtenidas mediante crossover PCR.

Para el pTGR28 se realizaron tres PCRs. La primera para amplificar la secuencia señal utilizando los cebadores PHODBSF y PHODZOEPLCPROR (Tabla 2) a partir de ADN genómico de *Bacillus subtilis* JH642 como molde. La segunda PCR utilizando los cebadores PLCPROF y PLCBCR3 a partir de ADN genómico de *B. cereus* ATCC 14579 como molde. Finalmente una tercera reacción utilizando los cebadores CSPBF y PLCBCR3 a partir de las dos PCRs anteriores como molde.

Para el pTGR30 también se realizaron tres PCRs. La primera para amplificar la secuencia señal utilizando los cebadores CSPBF y CSPBZOEPLCPROR (Tabla 2) a partir de ADN genómico de *C. glutamicum* como molde. La segunda PCR utilizando los cebadores PLCPROF y PLCBCR3 a partir de ADN genómico de *B. cereus* ATCC 14579 como molde. Finalmente una tercera reacción utilizando los cebadores PHODBSF y PLCBCR3 a partir de las dos PCRs anteriores como molde.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el siguiente medio de reacción para un volumen final de 50 μ l: buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,05 mM cada uno, oligonucleótidos 0,4 μ M cada uno, 2,5 U de pfu polimerasa y se utilizó el termociclador My Cycler (BioRad, EEUU). Según se indique las reacciones de PCR

fueron realizadas a partir de una preparación de ADN genómico o plasmídico. Los programas de PCR se ajustaron a los siguientes pasos: primero 1 ciclo de desnaturalización durante 2 min a una temperatura de 98°C. Luego siguieron 30 ciclos de desnaturalización durante 1 min a 98°C, hibridación durante 30 seg (realizadas a 4 grados menos que la temperatura de “melting” del cebador) y extensión a 72°C durante 1 min por cada kbp del fragmento a amplificar. Finalmente un paso de extensión de 10 min a 72°C.

Purificación enzimática

La enzima BC-PLC fue recuperada por precipitación utilizando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para ello a 100 mL de sobrenadante de cultivo se le agregaron 37 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se incubó por 1 h a 4°C. Luego fue centrifugado a máxima velocidad y el pellet obtenido fue resuspendido en el mismo volumen y dializado en buffer conteniendo 20 mM acetato de sodio a pH 6, 10% glicerol, 1 mM ZnSO_4 . La concentración de proteínas fue determinada por el método del ácido bincinconínico utilizando BSA como estándar [164].

Ensayo de desgomado enzimático a escala de laboratorio

Los experimentos de desgomado enzimático fueron realizados utilizando 1 kg de aceite crudo de soja. Este fue incubado en un baño termostático con agitación continua durante el tiempo de la reacción. Inicialmente 5 mg de BC-PLC, pre tratada con 2 $\mu\text{g/mL}$ de tripsina, es agregada en 30 mL de buffer citrato 50mM pH6 y mezclada con 1 kg de aceite crudo. Luego la mezcla es emulsionada utilizando un homogenizador Ultra-Turrax T50 y luego se mantuvo en agitación constante durante 2 h a 50°C. Finalmente, para cortar la reacción, la enzima es inactivada por calor a 85°C durante 10 minutos.

Determinación del contenido de DAG

El contenido de diacilglicéridos (DAGs) fue determinado mediante el método recomendado por la Sociedad Americana de Químicos del Aceite (AOCS). Este método cuantifica mediante el uso de un cromatógrafo de alta presión (HPLC) Agilent LC1260 acoplado a un detector de dispersión de la luz (ELSD) SEDERE

model Sedex 75 utilizando 1,3 dipalmitina (Sigma) como estándar. 20 µl de la muestra o estándar son separados en una columna de sílica (Chromegasphere Silica, Adsorption Phase HPLC Columns, 60 Å, ES Industries) e incubados a 40°C. Luego utilizando una ganancia de 5 en el detector ELSD se cuantifican los DAGs presentes en la muestra

Secuenciación Amino terminal

Las muestras de proteínas (BC-PLC secretada antes y después del tratamiento con tripsina), fueron corridas en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, transferidas a una membrana de PVDF (Amersham Hybond P) y teñidas con Rojo Ponceau (Sigma) 0,1%. Luego las bandas fueron cortadas y enviadas para secuenciar por el método de degradación de Edman en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicios en péptidos y proteínas. LANAIS PROEM, UBA.

Ruptura celular por sonicación

Inicialmente se separaron por centrifugación las células del sobrenadantes de cultivo. Luego las células fueron resuspendidas en buffer 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 25 mM MgCl₂, 200 mM NaCl y homogenizadas en hielo mediante el sonicador GEX 600 Ultrasonic Processor durante 2 minutos.

Cultivos de alta densidad de *C. glutamicum*

Los inóculos de las fermentaciones se crecieron a 30°C y 200 RPM en erlenmeyers de 1 L conteniendo 100mL del medio semi definido y Kanamicina cuando fue necesario. Las fermentaciones en lote alimentado (Fed-batch) fueron hechas en un reactor de 2 L a escala de laboratorio (New Brunswick BioFlo 115, USA) conteniendo 1 L del mismo medio. La temperatura y agitación fueron mantenidas a 30°C y 1200 RPM respectivamente. El pH fue mantenido en 7 mediante el agregado de NH₄OH 25% y el porcentaje de oxígeno disuelto fue del 30% de la saturación de aire utilizando enriquecimiento con oxígeno puro cuando fue necesario. Luego de inocular el fermentador se inició una fase de Batch en la cual se

agregó glucosa a una concentración inicial de 10 g/L. Una vez que se agotó esta fuente de carbono se comenzó con la fase de alimentación (Fed-batch). La misma se realizó con una solución de glucosa 600 g/L, 2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 24 g/L de extracto de levadura, utilizando los flujos necesarios para mantener un crecimiento exponencial a una velocidad específica igual a la mitad de la máxima determinada en cada caso. La concentración de glucosa remanente se determinó mediante el kit de glicemia de Wiener Lab según las condiciones del fabricante.

Tabla 2

| Cebador | Secuencia |
|-----------------------|---|
| PLCBCF | 5'-GAGCATATGAAAAAGAAAGTACTTGC-3' |
| PLCBCR3 | 5'-GAGCCTAGGTAAACGATCTCCGTACG-3' |
| CSPBF | 5'-TTTTTCATATGTTTAACAACCGTATC-3' |
| CSPBZOEPLCPROR | 5'-GTCCCCCATCATTTTCATGAGCGAATGCTGGGATAGC-3' |
| PLCPROF | 5'-CATGAAAATGATGGGGGACAGAG-3' |
| PHODBSF | 5'-GAGCATATGGCATAACGACAGTCG -3' |
| PHODZOEPLCPROR | 5'-GTCCCCCATCATTTTCATGAGCATTACTTCAAAGGCC-3' |

Tabla 2. Lista de cebadores utilizados en este trabajo de tesis.

Resultados y discusión

Capítulo 1

Resultados

Diseño racional de un vector de expresión estándar para *C. glutamicum*.

Diseño y construcción

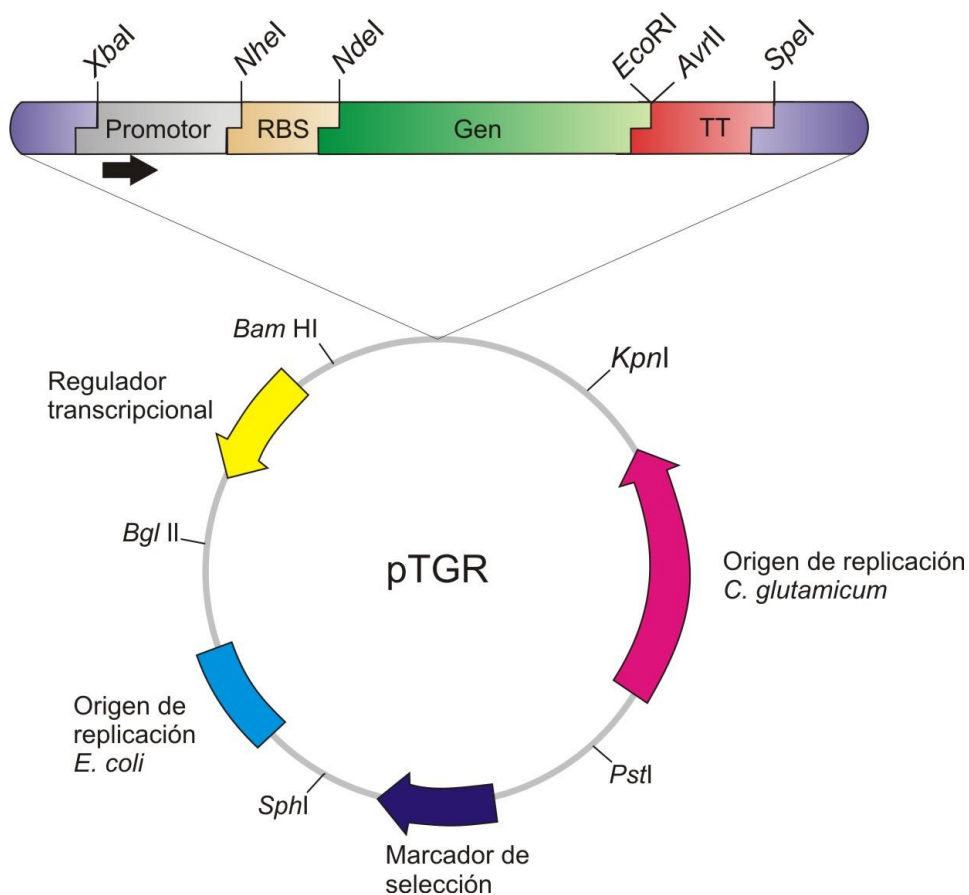
Un requisito fundamental para poder expresar en forma rápida genes individuales o de rutas biosintéticas es disponer de herramientas que permitan el clonado rápido de genes y su expresión regulada en respuesta a determinadas señales [165]. En la primera etapa de este proyecto, utilizando como base el vector de expresión pEC-XK99E [104], se diseñó y se encargó la síntesis de un vector replicativo en *E. coli* y *C. glutamicum* denominado pTGR. Como se puede observar en la Figura 6A cada una de las partes biológicas o Biobricks de este vector se encuentran flanqueadas por sitios de restricción únicos. Los sitios *Xba*I y *Nhe*I flanquean al promotor; *Nhe*I y *Nde*I al sitio de unión al ribosoma (RBS); *Nde*I y *Eco*RI o *Avr*II al gen de interés; *Eco*RI o *Avr*II y *Spe*I o *Kpn*I al terminador transcripcional (TT); *Spe*I o *Kpn*I y *Pst*I al origen de replicación de la especie seleccionada (en este caso *C. glutamicum*); *Pst*I y *Sph*I al marcador de selección; *Sph*I y *Bgl*II al origen de replicación en *E. coli* y *Bgl*II y *Bam*HI o *Xba*I al regulador transcripcional. Los mismos estarán siempre ausentes en el resto de la secuencia, permitiendo de esta manera el rápido intercambio de las partes para su evaluación.

Por otro lado, a partir esta plataforma también pueden ser obtenidas rápidamente construcciones que permitan la expresión de simultánea de varios genes en diversos formatos. Como se observa en la Figura 6B el vector pTGR permite la construcción de operones o de “clusters” con unidades transcripcionales individuales según sea necesario. Un operón puede ser fácilmente obtenido aprovechando los dos sitios ubicados luego de la secuencia codificante del gen de interés. Para ello, primero este debe ser clonado entre los sitios *Nde*I-*Eco*RI, luego realizar una escisión del fragmento *Nhe*I-*Avr*II y finalmente una ligación en el sitio *Avr*II de otro vector. Una digestión con *Nhe*I y *Avr*II genera extremos cohesivos compatibles, por lo tanto, una ligación en orientación correcta permite obtener un operón donde el sitio *Avr*II es restituido, de manera que puede utilizarse en forma recursiva para la inserción de genes adicionales. De la misma manera, pueden ser obtenidas construcciones conteniendo múltiples unidades transcripcionales. En este

caso mediante la escisión de un fragmento *Xba*I-*Spe*I que contiene una unidad transcripcional y posterior inserción en el sitio *Spe*I de otro vector. En aquellas construcciones que posean la orientación correcta el sitio *Spe*I es regenerado permitiendo la inserción de una nueva unidad.

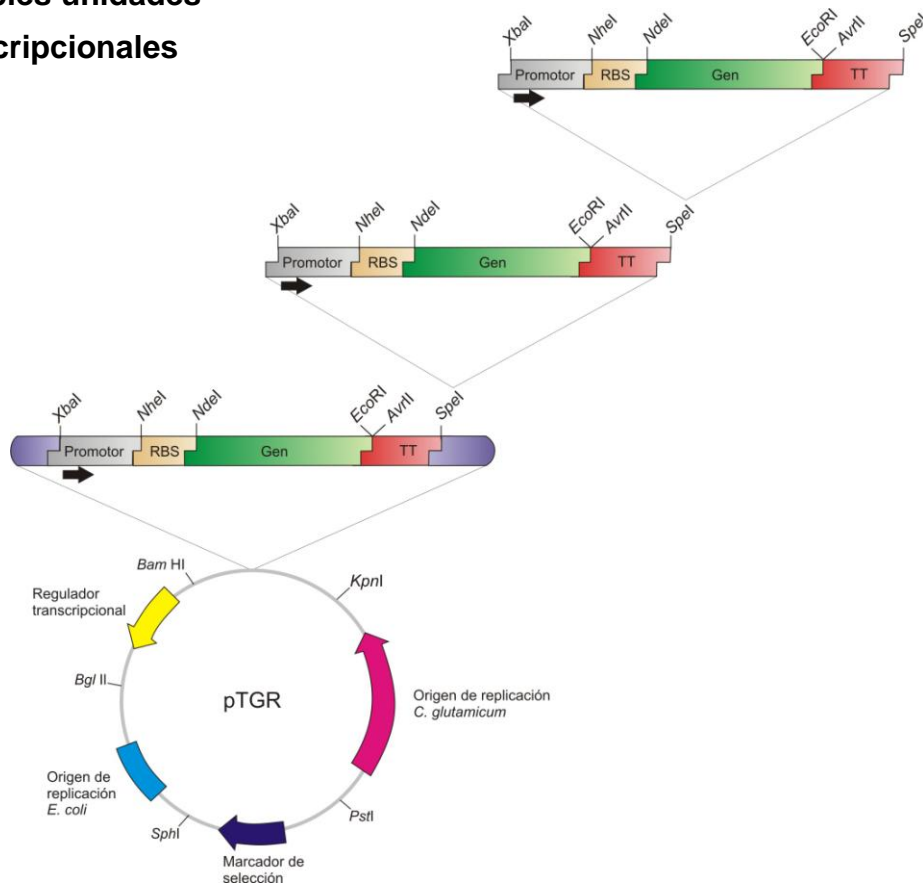
Figura 6

A



B

Múltiples unidades transcripcionales



Operones

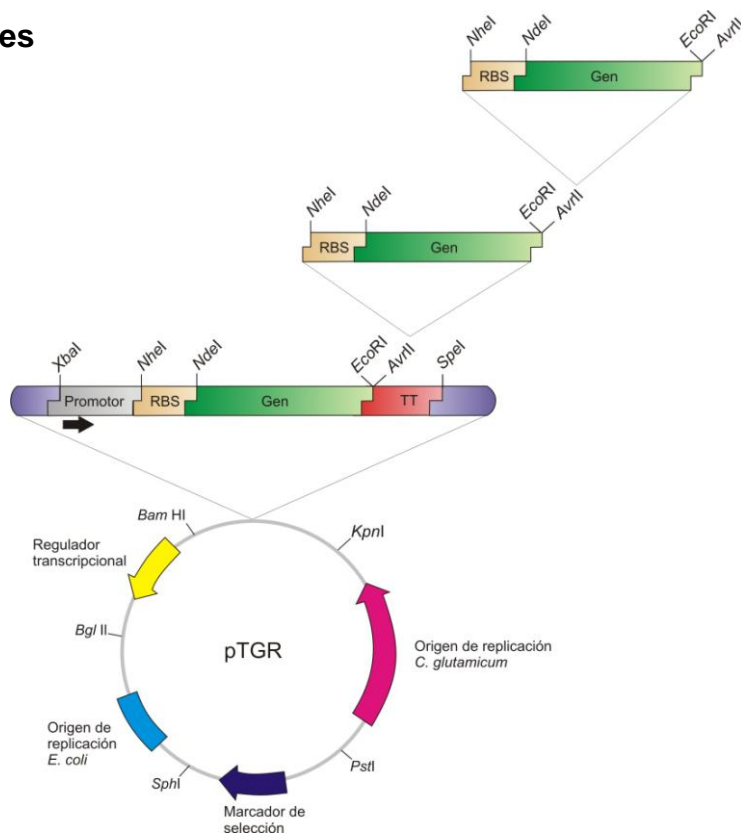


Figura 6. Representación esquemática del diseño del vector sintético pTGR (A). Tipos de construcciones que pueden obtenerse a partir del vector pTGR las cuales permiten la expresión simultánea de varios genes (B). La figura no se encuentra a escala.

Validación experimental:

Análisis sistemático de elementos regulatorios involucrados en la biosíntesis de proteínas en *C. glutamicum*

Si bien en la bibliografía se ha reportado la caracterización de distintos elementos regulatorios involucrados en la síntesis de proteínas en *C. glutamicum* [166], los mismos no fueron evaluados y catalogados en forma sistemática de manera de obtener los mejores rendimientos en la expresión de proteínas heterólogas. Es por esto que en esta etapa inicial del trabajo se utilizó el vector sintético construido previamente para estudiar y clasificar distintos elementos regulatorios tales como promotores y sitios de unión a ribosomas.

Ensayo *in vivo* de actividades promotores y RBSs

Uno de los objetivos considerados al diseñar el vector pTGR, fue su utilización para la rápida evaluación de elementos regulatorios de la expresión génica en *C. glutamicum*. De esta manera, al obtener una colección de elementos que permitan la expresión controlada de genes de interés, la ingeniería genética en esta especie resultaría mucho más ágil.

Para validar experimentalmente la plataforma desarrollada, fue construido el plásmido sintético pTGR1 el cual contiene el mini replicón del vector pGA1 de *C. glutamicum* [167], el origen de replicación ColE1 de *E. coli* [168], los terminadores transcripcionales *rrnBT1* y *rrnBT2* [169], de la misma especie, dispuestos en tándem y el gen de la aminoglucósido fosfotransferasa *aph(3')-IIa* que confiere resistencia al antibiótico Kanamicina [170]. A continuación se clonó entre los sitios *NdeI-EcoRI* una versión sintética del gen que codifica la proteína fluorescente verde (eGFP) [171] para ser utilizada como reportero y se insertó entre los sitios *NheI-NdeI* el RBS del gen *sod* de *C. glutamicum* para obtener el vector pTGR2 (Tabla 3). A continuación,

fueron clonados en los sitios *XbaI-NheI* del pTGR2 tres fragmentos sintéticos de DNA que contienen las secuencias promotoras de los genes *sod* y *cspB* de *C. glutamicum* y el promotor híbrido *tac* de *E. coli* [172] para obtener los vectores pTGR3, pTGR4 y pTGR5 (Tabla 3). Estos promotores fueron elegidos en base a su actividad en *C. glutamicum*, la cual fue reportada para la expresión de proteínas heterólogas en esta especie [173-175]. Por último fue insertado entre los sitios *BamHI-BglII* del plásmido que contiene el promotor *tac*, un casete sintético que contiene el represor *lac^I* de *E. coli* [176], con el fin de inducir la expresión mediante la presencia de la molécula de IPTG.

La Figura 7 muestra la expresión del reportero eGFP bajo el control de los tres promotores seleccionados en *C. glutamicum* en función del tiempo. En los experimentos en donde la expresión del gen reportero se encontraba bajo el control de promotor *tac*, se agregó en los cultivos IPTG a una concentración de 0,5 mM. La expresión desde los promotores *cspB* y *sod* no requieren de la adición de un inductor exógeno ya que estos promotores dependen de la fase de crecimiento [177]. Como se puede observar en la figura, la máxima cantidad de expresión de eGFP por célula fue obtenida luego de 24 h, cuando los cultivos llegan a fase estacionaria. Además no fue detectada fluorescencia basal de eGFP en ausencia de promotores. Claramente los tres promotores elegidos para probar en la plataforma pTGR, mostraron diferentes niveles de expresión bajo las condiciones ensayadas: expresión alta (*tac*), expresión media (*cspB*) y expresión baja (*sod*). Esto demuestra que el vector pTGR puede servir para ensayar y evaluar rápidamente fuerza de promotores.

Figura 7

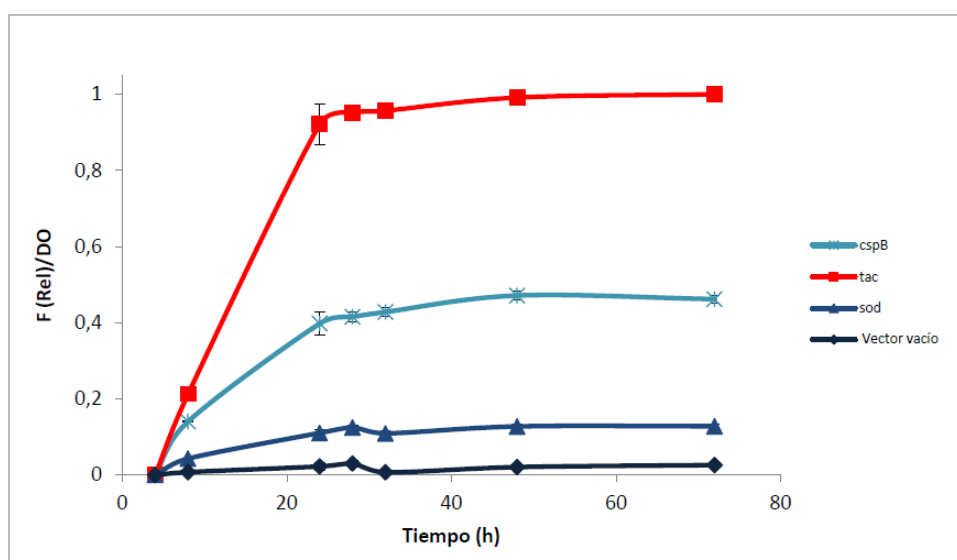


Figura 7. Ensayo de actividad *in vivo* de promotores. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

Para evaluar actividades de distintos RBSs, las secuencias Shine-Dalgarno del pTGR5 fueron reemplazadas por las secuencias del gen *lacZ* de *E. coli* y *cspB* de *C. glutamicum* para crear los vectores pTGR6 y pTGR7 respectivamente (Tabla 3). En todos los casos fue mantenida la distancia entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio ATG de los genes nativos. La misma es un factor crítico que puede afectar el proceso traducción [178-180]. Los plásmidos pTRG5, pTGR6 y pTGR7, los cuales contienen el gen de la eGFP bajo el control del promotor *tac* pero con diferentes RBSs (Figura 14), fueron transformados en *C. glutamicum*. La Figura 8 muestra que la expresión de eGFP puede ser modulada cambiando este elemento regulador. El RBS *sod* demostró el nivel más alto de expresión de eGFP, el RBS *lacZ* demostró un nivel medio, mientras que el RBS *cspB* fue apenas superior que el control negativo. El resultado de este ensayo demuestra que el vector pTGR también sirve para ensayar y clasificar RBSs.

Figura 8

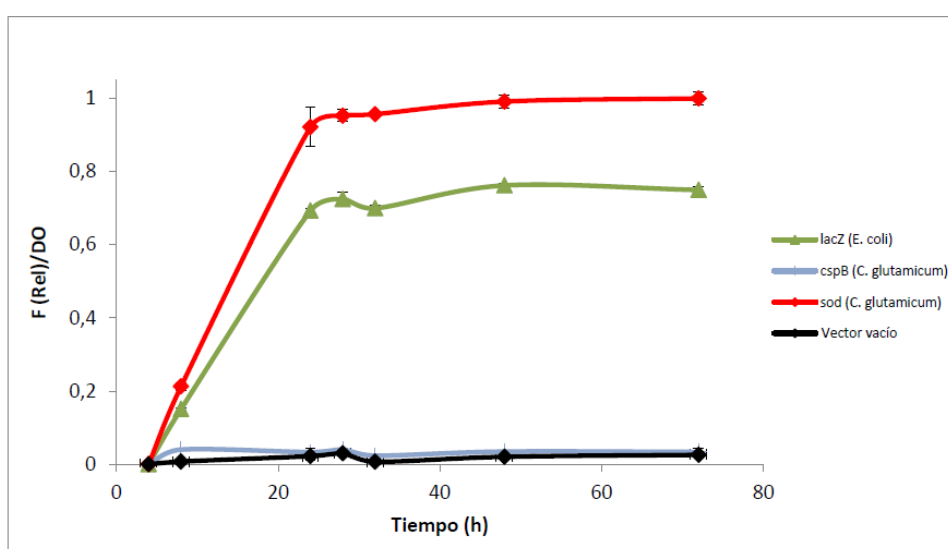


Figura 8. Ensayo de actividad *in vivo* de RBSs. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

Ensayo *in vivo* de operones y unidades transcripcionales independientes en *C. glutamicum*

El sistema pTGR fue diseñado para facilitar construcciones que permitan la expresión de uno o varios genes. En este último caso, dos formatos diferentes son posibles, el ensamblado de operones o el de “clusters” conteniendo más de una unidad transcripcional. Con el objetivo de validar el sistema, inicialmente fue construido un operón con dos genes reporteros, uno que codifica para la eGFP y un segundo gen que codifica para la proteína fluorescente roja mCherry [181]. El operón fue ensamblado en dos pasos de clonado para obtener el plásmido pTGR8 (Tabla 3 y Figura 14). Primero, los marcos abiertos de lectura (ORFs) sintéticos que codifican ambas proteínas fluorescentes fueron insertados entre los sitios *NdeI*-*EcoRI* del pTGR que contiene al promotor *tac* y al RBS *sod*. Luego, el fragmento *NheI*-*AvrII* que contiene la fusión <RBS *sod* – ORF eGFP> fue movilizado al sitio *AvrII* del plásmido que contenía a la mCherry. Como se puede observar en la Figura 9, en ensayos de expresión *in vivo* del operón resultante se puede observar la co-expresión de ambas proteínas fluorescentes desde el promotor *tac*.

Figura 9

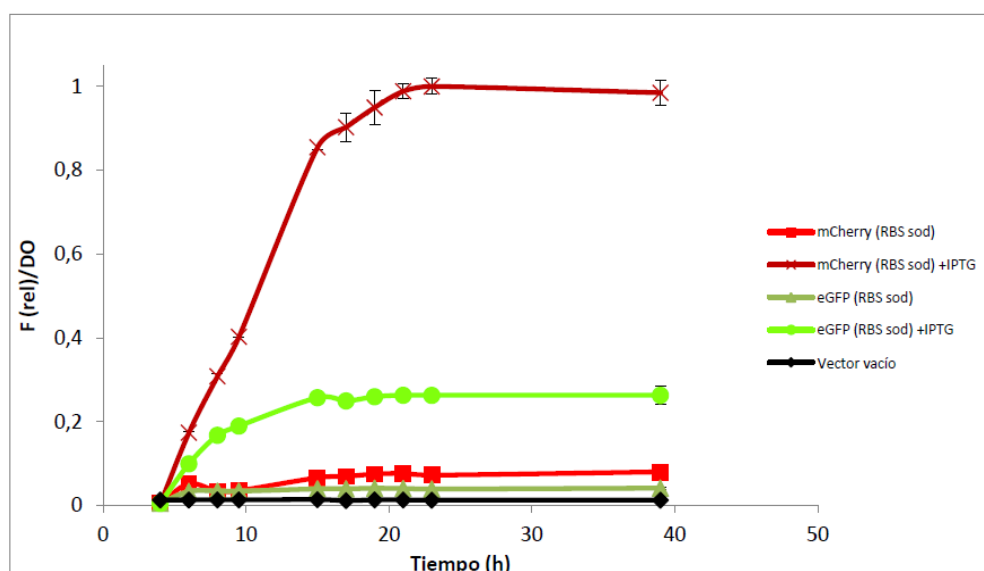


Figura 9. Ensayo de actividad *in vivo* de operones. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP y mCherry normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

Posteriormente, fue construido un “cluster” que contiene dos unidades transcripcionales independientes para validar el segundo tipo de ensamblado que permite este sistema. Este tipo de construcción también requiere dos pasos de clonado. Primero los ORF sintéticos que codifican las dos proteínas fluorescentes fueron insertados, como fue descrito previamente, en el vector pTGR conteniendo el promotor *tac* y el *sod*. Segundo, el fragmento *Xba*I-*Spe*I que contiene la fusión <promotor *sod* - RBS *sod* - mCherry - terminador transcripcional> fue movilizaba al sitio *Spe*I del plásmido pTGR5 que contiene el gen eGFP bajo el control transcripcional del promotor *tac* y el RBS *sod* para obtener el vector pTGR9. Luego de la inducción con IPTG, se puede observar en la Figura 10 la expresión simultánea de ambas proteínas fluorescentes.

Figura 10

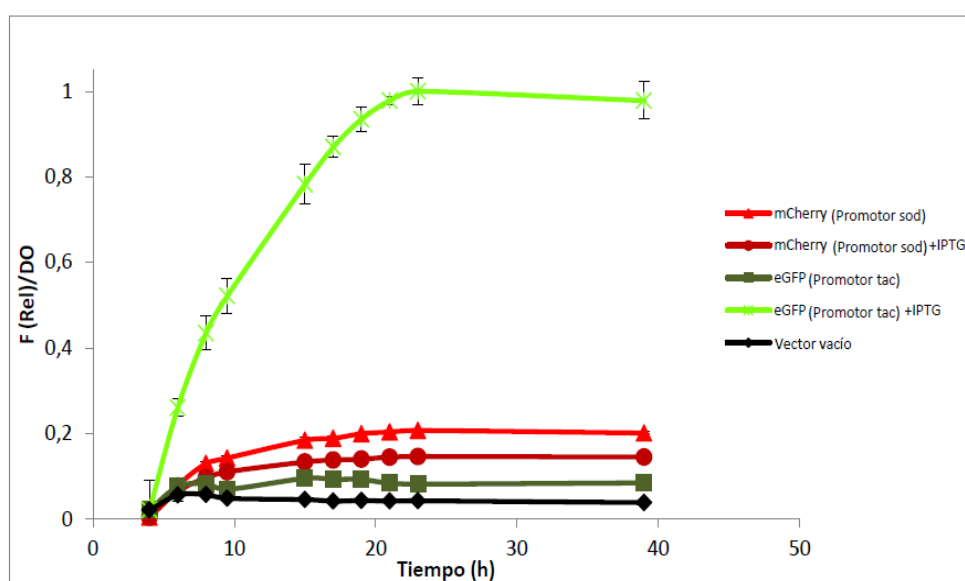


Figura 10. Ensayo de actividad *in vivo* de unidades transcripcionales múltiples. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP y mCherry normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

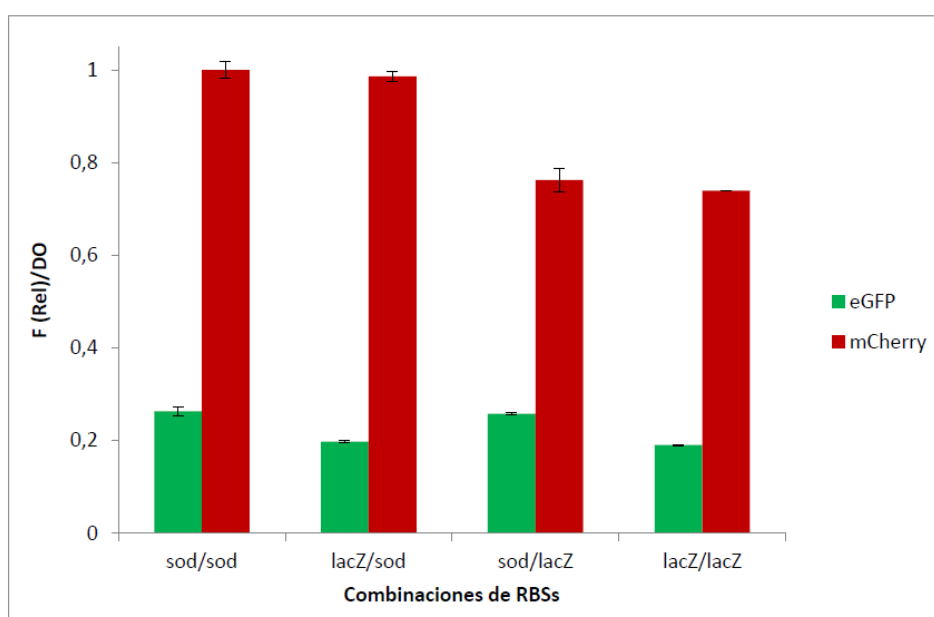
Experimentos adicionales fueron realizados con el objetivo de demostrar que el sistema del vector pTGR permite que las cantidades de ambas proteínas sean alteradas utilizando RBSs con distinta afinidad en el caso de operones o promotores con distinta fuerza en caso de unidades transcripcionales múltiples. Primero fue modificado el operón contenido en el vector pTGR8, reemplazando el RBS *sod* que

controla la traducción de mCherry por el RBS *lacZ* para obtener el plásmido pTGR10 (Tabla 3 y Figura 14). De acuerdo a lo esperado, cuando se utiliza esta construcción la cantidad de mCherry fue menor que la obtenida cuando el RBS *sod* fue utilizado (Figura 11A). A continuación fue creado un nuevo plásmido llamado pTGR11 en el cual el RBS *sod*, que controla la traducción de eGFP, es también es reemplazado por el RBS *lacZ* quedando la expresión de ambos genes controlada por el mismo RBS. En este caso también fue observada una reducción en la fluorescencia relativa para los dos genes reporteros comparada a la que se obtuvo con el pTGR8 (Figura 11A). Luego, se obtuvo un nuevo operón controlado por el promotor *tac* el cual fue clonado en un nuevo plásmido denominado pTGR12. En este vector el gen de la mCherry se encuentra bajo el RBS *sod* y el de la eGFP bajo RBS *lacZ* (Figura 14) invirtiendo la configuración obtenida en el pTGR10 y demostrando la versatilidad de este sistema para regular la expresión en sistemas de expresión que contienen más de un gen (Figura 11A).

Finalmente, fueron obtenidos dos “clusters” adicionales conteniendo dos unidades transcripcionales independientes con diferentes combinaciones de promotores para llevar a cabo expresión de eGFP y mCherry (plásmidos pTGR13-14 y 15 en Tabla 3 y Figura 14). La Figura 11B muestra que la fluorescencia relativa de las dos proteínas puede ser alterada utilizando promotores con distinta fuerza, indicando que ésta estrategia también permite modular la expresión de varios genes simultáneamente desde este tipo de formato.

Figura 11

A



B

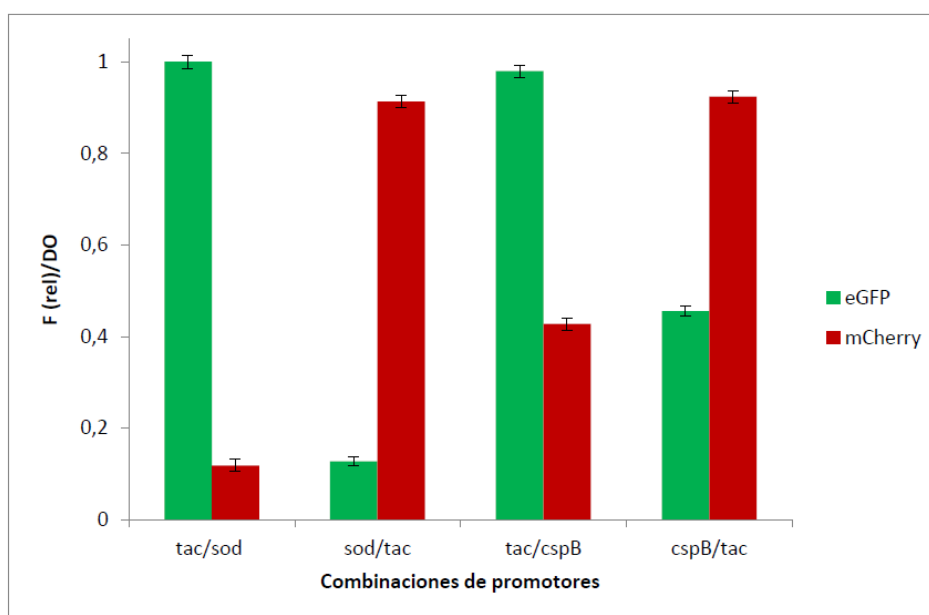


Figura 11. Ensayo de actividad *in vivo* de operones (A) y unidades transcripcionales (B). Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP y mCherry normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm luego de 24hs de iniciado el cultivo *C. glutamicum*.

Ensayos *in vivo* de actividad de un gen reportero variando elementos no relacionados con la regulación de la expresión génica.

Variación de la concentración del inductor

Con el fin de explorar alternativas adicionales para ajustar la expresión génica utilizando la plataforma pTGR, se ensayó inicialmente el nivel de expresión de eGFP bajo diferentes concentraciones de IPTG. Para ello se utilizó el pTGR5, presentado previamente, el cual expresa el gen de la eGFP bajo el promotor híbrido de *E. coli* *tac* y el RBS del gen *sod* de *C. glutamicum*.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 12 donde se puede observar, en ensayos de actividad *in vivo* del cultivos de *C. glutamicum* que expresan el gen reportero, que se obtuvo variación en los niveles de expresión en el intervalo entre 0,025 - 0,25 mM. El hecho de que no se observe ningún incremento adicional en los niveles de fluorescencia relativa por encima de 0,25 mM sugiere un efecto de saturación a dicha concentración de inductor. Estos resultados indican que

una nueva instancia de regulación se puede explotar cuando se utiliza el promotor *tac* para conducir la expresión de genes heterólogos con el sistema pTGR en *C. glutamicum*.

Figura 12

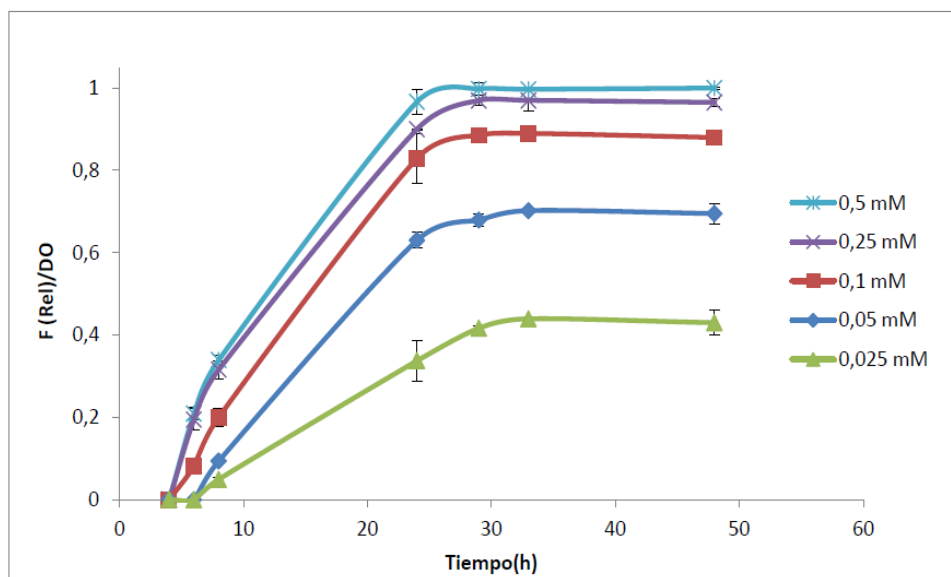


Figura 12. Ensayo de actividad *in vivo* de eGFP variando la concentración del inductor. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP normalizada respecto a la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

Intercambio de orígenes de replicación en *C. glutamicum*

Además de las características ensayadas previamente, la variación de la dosis génica, podría representar una opción adicional para regular la expresión de proteínas en este microorganismo. Para probar la viabilidad de este enfoque utilizando la plataforma pTGR, se decidió intercambiar el origen de replicación del plásmido pTGR5 el cual tiene un número de copias medio (~30 por célula) dado por el replicón proveniente del plásmido endógeno pGA1 de *C. glutamicum*.

Para cumplir este objetivo fueron diseñados y encargados para su síntesis Biobricks que contienen los orígenes de replicación de los vectores pCRY4 [182] y pNG2 [183, 184], los cuales tienen un bajo número de copias (~1-2 por célula). Luego ambas versiones fueron clonadas, entre los sitios *KpnI* y *PstI* del pTGR6, para dar lugar a los nuevos vectores pTGR16 y pTGR17 (Tabla 3). Finalmente se transformaron en *C. glutamicum* y se llevaron a cabo ensayos de actividad *in vivo*

para validar la hipótesis. En la Figura 13 se puede observar una disminución en los niveles de fluorescencia relativa para los plásmidos de menor número de copia, lo cual demuestra que esta estrategia puede ser adecuada también para regular finamente la expresión de genes heterólogos en esta especie.

Figura 13

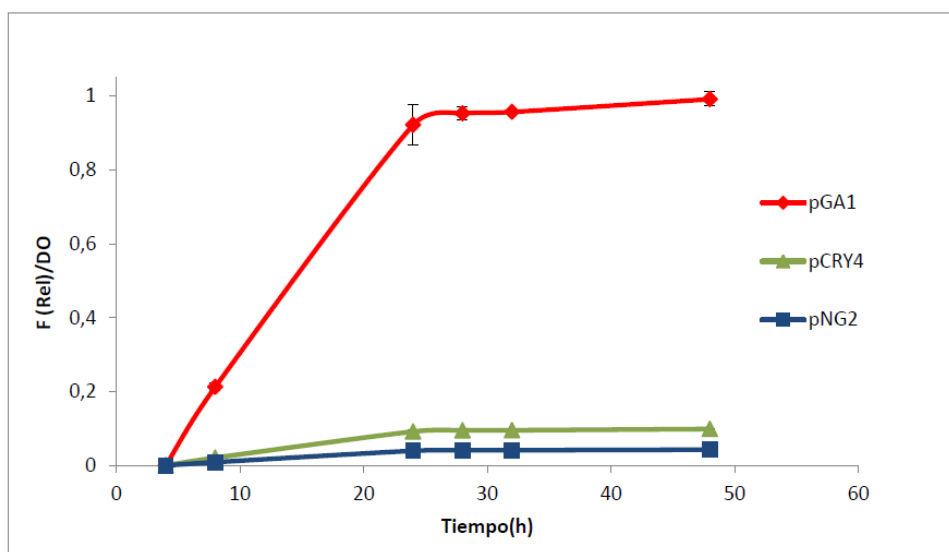


Figura 13. Ensayo de actividad *in vivo* de eGFP utilizando distintos orígenes de replicación. Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de eGFP sobre la densidad óptica medida a 600nm durante el crecimiento de *C. glutamicum*.

Tabla 3

| Plásmido | Replicón | Promotor | RBS | Gen |
|----------|----------|--------------------------|---------------------------|----------------|
| pTGR1 | pGA1 | - | - | - |
| pTGR2 | pGA1 | - | <i>sod</i> | eGFP |
| pTGR3 | pGA1 | <i>sod</i> | <i>sod</i> | eGFP |
| pTGR4 | pGA1 | <i>cspB</i> | <i>sod</i> | eGFP |
| pTGR5 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | eGFP |
| pTGR6 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>lacZ</i> | eGFP |
| pTGR7 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>cspB</i> | eGFP |
| pTGR8 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> / <i>sod</i> | mCherry / eGFP |
| pTGR9 | pGA1 | <i>tac</i> / <i>sod</i> | <i>sod</i> / <i>sod</i> | eGFP / mCherry |
| pTGR10 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>lacZ</i> / <i>sod</i> | mCherry / eGFP |
| pTGR11 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>lacZ</i> / <i>lacZ</i> | mCherry / eGFP |
| pTGR12 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> / <i>lacZ</i> | mCherry / eGFP |
| pTGR13 | pGA1 | <i>sod</i> / <i>tac</i> | <i>sod</i> / <i>sod</i> | eGFP / mCherry |
| pTGR14 | pGA1 | <i>tac</i> / <i>cspB</i> | <i>sod</i> / <i>sod</i> | eGFP / mCherry |
| pTGR15 | pGA1 | <i>cspB</i> / <i>tac</i> | <i>sod</i> / <i>sod</i> | eGFP / mCherry |
| pTGR16 | pCRY4 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | eGFP |
| pTGR17 | pNG2 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | eGFP |

Tabla 3. Serie de plásmidos derivados del pTGR obtenidos en esta parte del trabajo.

Figura 14

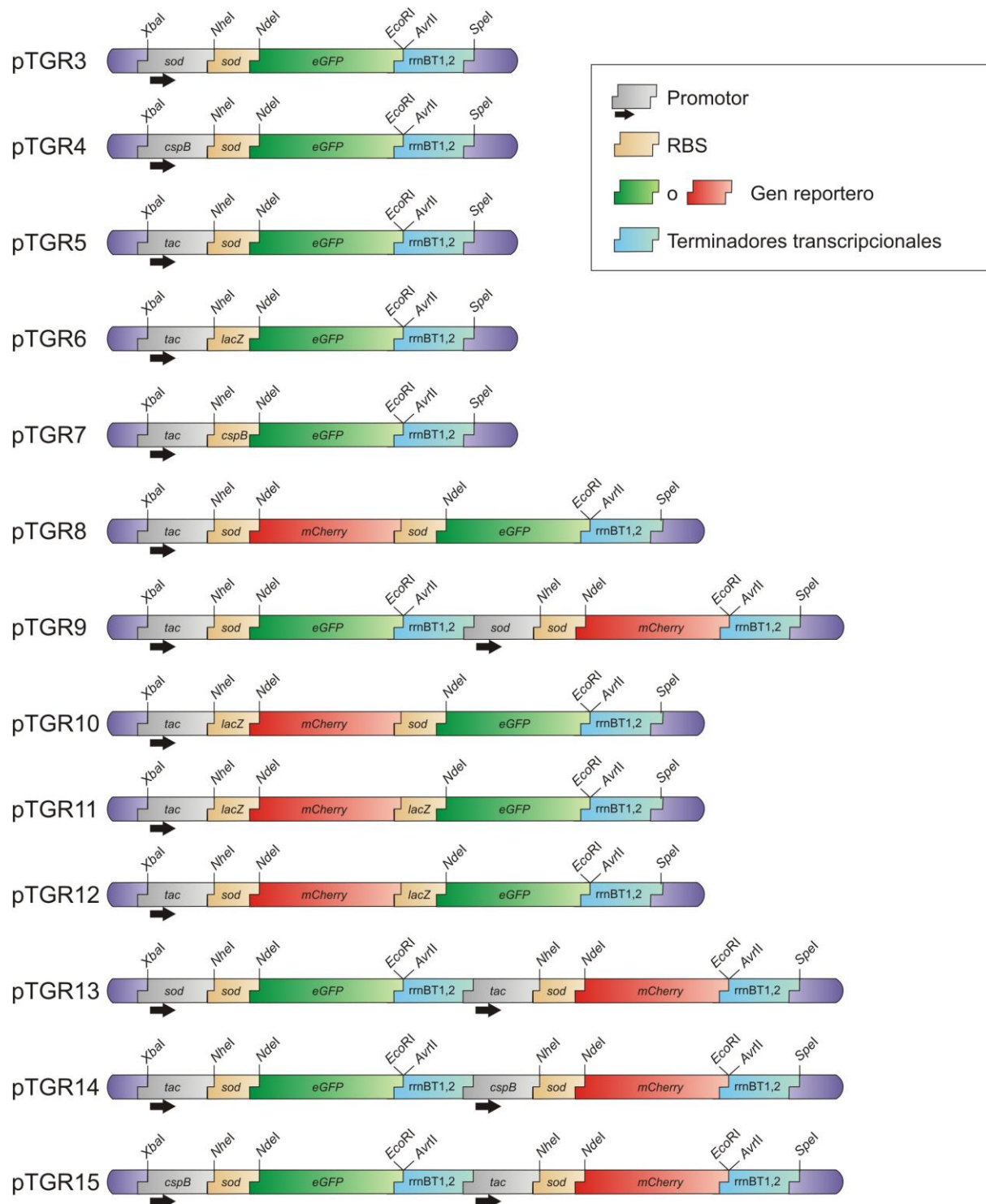


Figura 14. Representación esquemática de las construcciones obtenidas a partir de la plataforma pTGR. La figura no se encuentra a escala.

Discusión

La construcción de cepas productoras de *C. glutamicum* fue en su mayoría realizada mediante ingeniería metabólica a partir del conocimiento obtenido de la elucidación de vías de síntesis [185]. Para ello a menudo se requiere un control simultáneo y equilibrado de varios genes implicados en una vía. Por lo tanto, es deseable una herramienta que incluya secuencias reguladoras que faciliten niveles predecibles de expresión génica.

En la actualidad, sólo se encuentran disponibles un conjunto limitado de vectores de expresión bien caracterizados para *C. glutamicum* [104, 105]. El diseño de plataformas que permitan explorar el potencial de nuevos Biobricks para regular la expresión génica y ensamblar circuitos genéticos para la ingeniería metabólica, facilita la expansión de la capacidad de este microorganismo de interés biotecnológico como un productor de compuestos valiosos.

La utilización de herramientas de biología sintética permite realizar una contribución significativa al avance de la ingeniería genética. Sin embargo, la mayoría de las herramientas de biología sintética han sido obtenidas para especies más comunes como *E. coli*. En este capítulo se desarrolló una plataforma que brinda la posibilidad de realizar modificaciones genéticas en *C. glutamicum* de manera rápida y eficiente. Para tal fin fue diseñado un vector sintético denominado pTGR, en el cual todos sus componentes están flanqueados por sitios de restricción que no se encuentran repetidos en el resto de la secuencia. Hasta el momento, una herramienta con formato estándar que facilite el rápido intercambio de sus elementos genéticos, no se encuentra descrita para esta especie.

Si se desea maximizar la producción de una proteína recombinante desde una vía metabólica, resulta imprescindible optimizar los niveles requeridos de las enzimas que la componen [186, 187]. Para alcanzar una regulación fina de la expresión génica, mediante la modulación de la transcripción o la traducción de los distintos componentes de la vía, resulta beneficioso disponer de una biblioteca de promotores o RBSs con diferentes fuerzas. En este sentido, la plataforma que provee el vector pTGR sirve como sistema de prueba estandarizado para evaluar la fuerza de promotores en *C. glutamicum*. Para validar esta aplicación, fueron clonados utilizando el formato estándar fragmentos sintéticos que contienen el

promotor *tac* de *E. coli*, los promotores *cspB* y *sod* de *C. glutamicum* y el gen de la proteína fluorescente verde como reportero para realizar en ensayos *in vivo*. Como resultado se obtuvieron tres niveles distintos de fluorescencia siendo al más alto el correspondiente al promotor *tac*, el más bajo para el *sod* y una señal media se obtuvo para el *cspB*. Este resultado no es sorpresivo ya que actualmente se encuentra reportado el uso de promotores de *E. coli* derivados del *lac* para sobreexpresar proteínas en *C. glutamicum* [104, 188, 189]. Además la región -10 del promotor *tac* es idéntica a la secuencia consenso encontrada frecuentemente entre los promotores de esta especie [177]. Por otro lado este promotor provee una instancia adicional en la regulación de la expresión mediante el agregado de diferentes concentraciones del inductor IPTG. Aunque en la actualidad ya se han descrito otros vectores que utilizan GFP como reportero para caracterizar promotores [190], ninguno tiene la versatilidad del pTGR para evaluar múltiples secuencias regulatorias.

En el proceso de traducción el paso de unión del ribosoma al ARN mensajero es un paso limitante. Debido a que no existen estructuras secundarias entre el RBS y la secuencia codificante, está demostrado que el RBS puede ser utilizado como elemento regulatorio de la expresión ya que se encuentra involucrado en la iniciación de la traducción [191, 192]. Por otro lado, recientemente fue descrito un método que permite diseñar RBS artificiales expandiendo el potencial de estas secuencias para ser utilizadas en circuitos génicos [193]. En este sentido el vector pTGR también puede ser utilizado para probar el efector modulador de la expresión que tienen los RBS. Para validar esta aplicación se probaron las secuencias correspondientes a los genes *lacZ* de *E. coli*, *cspB* y *sod* de *C. glutamicum* utilizando GFP como reportero bajo el control del promotor *tac*. Los resultados también demostraron distintos niveles de fluorescencia en los ensayos *in vivo*, lo cual demuestra la versatilidad de esta plataforma como vector de prueba de elementos regulatorios.

Por otra parte a partir del vector pTGR se pueden obtener rápidamente construcciones que permitan la expresión simultánea de varios genes como operones o clústeres con varias unidades transcripcionales individuales según sea necesario. En este caso, es de esperar que los niveles de expresión mediados por los promotores y RBS observados en los experimentos individuales puedan anticipar el comportamiento de estas partes en un contexto más complejo como un operón.

Esto podría facilitar la clasificación de las partes regulatorias en la expresión de genes en una vía metabólica. Sin embargo los niveles de expresión de estas partes podrían ser dependientes del contexto. Por lo tanto, obtener el equilibrio óptimo para todas las enzimas de una vía, especialmente para las que tienen un número alto de genes, puede requerir varias pruebas para determinar las secuencias reguladoras adecuadas. Es más, en la mayoría de los casos los niveles óptimos de expresión de las enzimas de una vía determinada son desconocidos y resultan necesarias construcciones combinatorias que utilicen una variedad de secuencias regulatorias hasta encontrar la proporción correcta de cada componente [194-196]. Además, en muchos casos también resulta necesaria una separación temporal de la expresión de las enzimas de una vía debido al impacto que puede tener, la expresión de proteínas heterólogas, sobre el metabolismo de un organismo [197, 198]. Estas aplicaciones fueron demostradas mediante la expresión simultánea de las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry desde distintas combinaciones de promotores y RBS en los diferentes formatos que el vector permite. Mediante ensayos de fluorescencia *in vivo* queda demostrada la capacidad que brinda la plataforma pTGR para modular finamente la expresión simultánea de proteínas en *C. glutamicum*.

Por último la plataforma ofrece otra característica para obtener niveles adicionales de regulación como es la modulación de la dosis génica. Quedó demostrado que los niveles de expresión eGFP también pueden ser controlados utilizando distintos orígenes de replicación con diferente número de copias.

Recién en el año 2014 se desarrolló una herramienta similar, a partir de una versión modificada de los vectores sintéticos BglBrick diseñados para *E. coli* [199], capaz de replicar en *C. glutamicum* denominada CoryneBrick. A diferencia del pTGR este vector no tiene flanqueado todos sus partes con sitios únicos y dispone de cuatro sitios de restricción (*EcoRI*, *BglII*, *BamHI* y *XhoI*) para realizar ensamblado de sus ORFs. Esta plataforma fue utilizada para probar la fuerza de los promotores de *E. coli* pTrc y pLacUV5, mediante un trabajo similar al realizado en esta tesis, utilizando como reporteros genes de proteínas fluorescentes verdes y rojas (GFP y RFP) [200].

Como fue mencionado previamente, *C. glutamicum* presenta una variedad de características que lo transforman en un microorganismo ideal para la producción de proteínas recombinantes. Entre ellas se destacan la escasa secreción de proteínas endógenas y actividad proteasa extracelular así como la capacidad de

crecer hasta altas densidades celulares en fermentadores y la presencia de sistemas de secreción eficientes [108, 110-112].

En la producción de proteínas heterólogas, un grupo de especial atractivo económico lo constituyen las enzimas industriales. Las mismas son comercializadas como productos básicos y hay una continua necesidad de reducir los costos de producción para que resulten competitivas en los mercados mundiales, los cuales en la actualidad representan varios billones de dólares [137, 201-203].

Aunque en esta parte del trabajo el pTGR sólo fue utilizado como prueba de concepto utilizando genes reporteros para comprobar sus propiedades, quedó demostrado que la plataforma que brinda este vector podría funcionar como herramienta para modular la expresión de los genes de una vía metabólica en una especie de gran interés biotecnológico como *C. glutamicum*. En perspectiva, esta herramienta podría hacer una contribución significativa en los procesos de producción de enzimas industriales en esta especie. El vector pTGR provee una plataforma que facilita la creación de circuitos génicos de diseño posibilitando una reducción en los tiempos de obtención de organismos genéticamente modificados. Es por ello que las ventajas evaluadas en este capítulo tendrán un gran impacto en futuros desarrollos de ingeniería metabólica de esta especie reduciendo costos y por lo tanto mejorando de economía de los procesos de manufactura.

Capítulo 2

Introducción

Sistemas de secreción de proteínas en bacterias

En bacterias existen dos vías principales de secreción de proteínas a través de la membrana plasmática. La primera de ellas es la vía general de secreción denominada Sec. Esta cataliza la traslocación de proteínas utilizando energía proveniente del ATP e involucra un complejo de proteínas unidas a la membrana denominado SecYEG [204]. Años después fue descubierto un segundo mecanismo, independiente del sistema Sec, denominado Tat por sus siglas en inglés twin-arginine translocation pathway. La característica sobresaliente de este sistema es que las proteínas son exportadas en su conformación y plegamiento original [205], a diferencia del sistema Sec en el cual se requiere el desplegamiento de la proteína para atravesar la membrana [206].

El sistema Sec

Básicamente, el sistema consiste en la proteína a exportar, una proteína motora y un canal proteico insertado en la membrana. La traslocasa de este sistema se encuentra presente en la membrana plasmática de todas las bacterias, archaeas y cloroplastos y resulta esencial para la viabilidad celular [207]. En bacterias es responsable por la secreción de la mayoría de las proteínas responsables del metabolismo, incorporación y secreción de metabolitos [208]. La secreción a través de este sistema puede ser co-traducciona y post-traducciona. En el último caso, las proteínas son guiadas hacia la traslocasa de membrana por la chaperona SecB, la cual las mantiene en su estado desnaturalizado luego de la síntesis [209]. Durante la secreción co-traducciona, la partícula de reconocimiento de señal (SRP), se une al péptido señal mientras emerge del ribosoma [210] y el complejo SRP-Ribosoma-proteína nascente es dirigido hacia la traslocasa mediado por la proteína FtsY. En bacterias este mecanismo es utilizado generalmente para la integración de proteínas de membrana. La traslocasa del sistema Sec está compuesta por un canal denominado PCC (por sus siglas en inglés Protein Conducting Channel) compuesto por tres proteínas integrales en la membrana SecY, SecE y SecG y una ATPasa

periférica llamada SecA, la cual es responsable de la traslocación de proteínas a través de la membrana (Figura 15) [206, 207]. SecA se asocia con PCC y acepta proteínas de la chaperona SecB o del ribosoma para canalizar a través del estrecho complejo formado por las proteínas Sec YEG. La energía para este proceso proviene de la fuerza protón-motriz (PMF) [204].

Figura 15

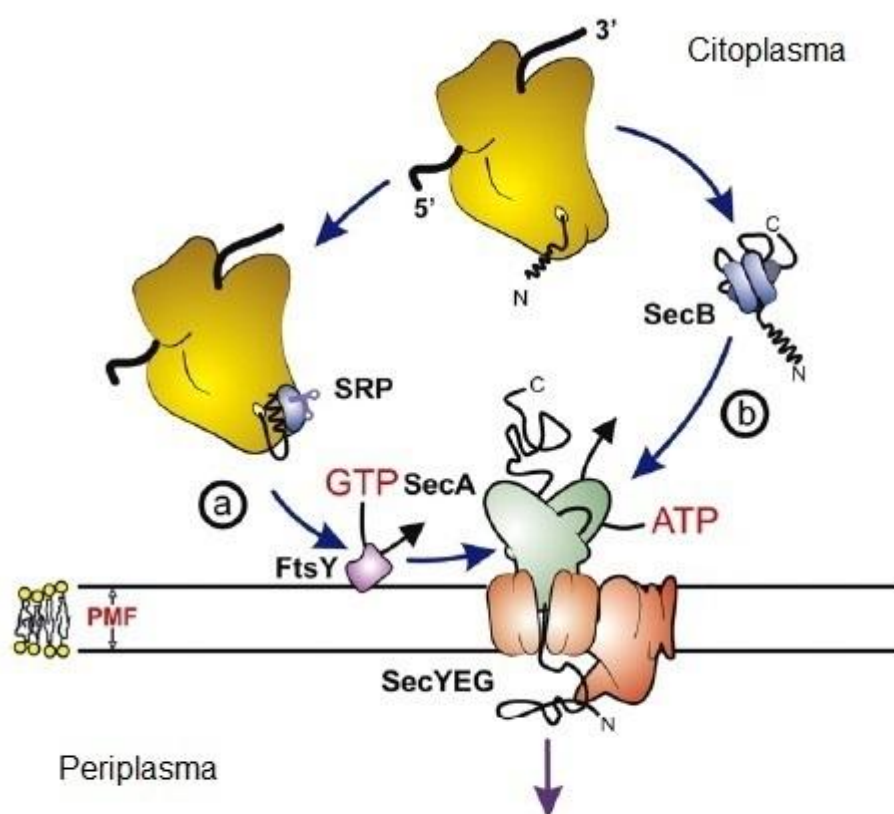


Figura 15. Modelo esquemático del sistema Sec en *E. coli* [204]. Secreción co-traducciona (a) o post-traducciona (b). PMF (fuerza protón motriz). Adaptado de Natale 2008 [204].

La secuencia señal del sistema Sec es una extensión amino terminal de las proteínas de secreción y resulta necesaria para la correcta traslocación a través de las membranas. Se encuentran conservadas entre los distintos dominios y posee una longitud promedio de 20 aminoácidos. Generalmente tiene una estructura tripartita conformada por una región cargada positivamente (región N), un núcleo hidrofóbico (región H) y una región polar carboxilo terminal (región C) (Figura 16). Esta región contiene el sitio de reconocimiento para la peptidasa denominado “Ala-

X-Ala” debido a presencia de dos alaninas en las posiciones -1 y -3 desde el sitio de corte [211]. La estructura tripartita es reconocida por los componentes del sistema Sec. La región H consiste en aminoácidos hidrofóbicos que forman una estructura de hélice α , mientras que la región N se encuentra cargada positivamente y es responsable de la interacción electrostática con los fosfolípidos de la membrana. Ambas regiones elementos necesarios y críticos reconocidos por la SRP y la proteína SecA. La afinidad del péptido señal por la SRP aumenta con la hidrofobicidad de la región H, mientras que la interacción con SecA se ve favorecida con el número de cargas positivas en la región N [212, 213].

Figura 16

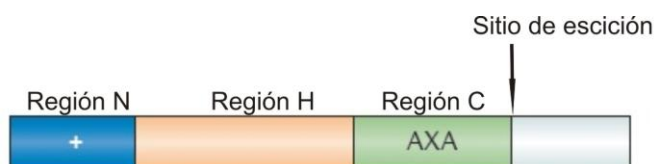


Figura 16. Representación esquemática de la estructura típica del péptido señal del sistema Sec. AXA representa el sitio de reconocimiento de la peptidasa. La figura no se encuentra a escala.

El sistema Tat

El sistema de secreción de proteínas Tat también se encuentra conservado en las membranas de bacterias, archaeas y tilacoides [214]. La maquinaria del sistema Tat consiste en dos o tres subunidades integradas a la membrana. TatA y TatC o TatA, TatB y TatC las cuales forman un receptor y una maquinaria de traslocación de proteínas en la cual la energía para el proceso es obtenida de la fuerza protón-motriz [204]. En *E. coli*, el sistema Tat parece operar con un mecanismo similar al de la maquinaria de los tilacoides, ambos requieren tres proteínas distintas unidas a membrana TatA, TatB y TatC [214]. Como se muestra en la Figura 17, el modelo actual postula que TatB y TatC forman un complejo y son requeridas para el reconocimiento y la unión del péptido señal [215]. TatA constituye

un complejo homo-oligomérico el cual es reclutado por el complejo TatB-TatC y forma un canal en el proceso de exportación [216]. Por otro lado, se han descrito otros componentes del sistema Tat, como la proteína TatE, el cual se descubrió que es un parólogo con funciones superpuestas de TatA [217]. Se ha propuesto además que el sistema Tat se utiliza sólo en los casos en los que el plegamiento citoplasmático excluye el uso del sistema Sec [218]. La presencia de la vía Tat para la secreción de proteínas es necesaria para una gran cantidad de sistemas redox y respiraciones anaeróbicas debido a que través del mismo se secretan cofactores necesarios para las oxidoreductasas [219].

Un estudio funcional de esta vía de secreción realizado en *C. glutamicum* determinó que las subunidades TatA, B y C son las unidades mínimas necesarias para lograr la secreción de proteínas mediante esta vía, donde además se demostró que TatA y C son esenciales para la traslocación de proteínas y que tatB no es esencial pero es necesario para obtener una máxima eficiencia en este proceso. Además se determinó que TatA y TatE tienen funciones superpuestas como previamente fuera descrito para *E. coli* [111].

Figura 17

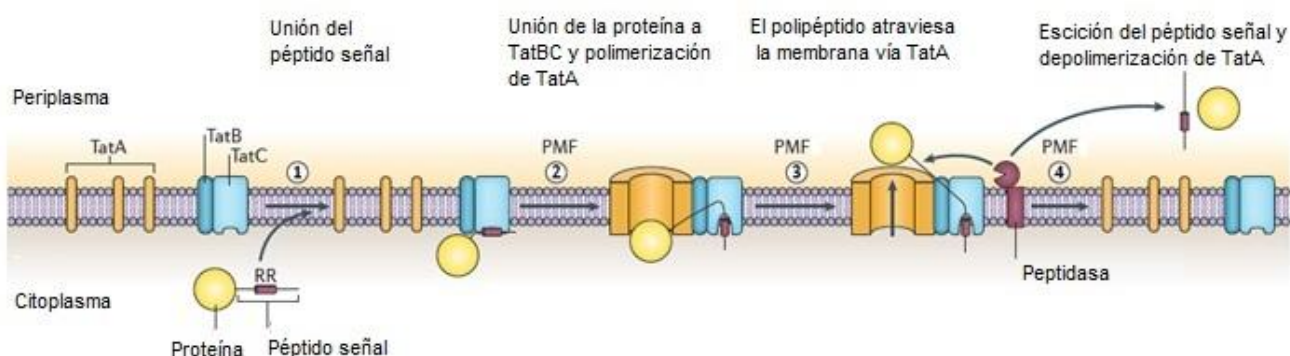


Figura 17. Modelo esquemático que representa el mecanismo de traslocación de proteínas a través del sistema Tat en *E. coli*. PMF indica fuerza protón motriz. Adaptado de Palmer 2012 [220].

Al igual que el sistema Sec, el péptido señal del sistema Tat, tiene una estructura tripartita con una región básica denominada “N” en el amino terminal, una región hidrofóbica denominada “H” en el medio y una región polar denominada “C” en el carboxilo terminal (Figura 18). Generalmente tiene mayor longitud que los del

sistema Sec debido a una región N con mayor cantidad de aminoácidos. Esta última contiene además residuos polares cargados positivamente y en ella se encuentra un motivo altamente conservado de dos argininas consecutivas (SRRXFLK) el cual brinda el nombre al sistema (Twin Arginine Translocation pathway) [221, 222]. Gracias a la carga positiva, la región N determina la orientación del péptido señal en la membrana [223, 224]. El “core” hidrofóbico consiste de entre 10 y 15 aminoácidos los cuales forman la región más larga del péptido señal que adoptan una conformación de hélice α una vez insertados en la membrana [225]. La región C también contiene el sitio de reconocimiento AXA. Para la posición -1, alanina, glicina y serina son los aminoácidos preferidos, por otro lado, en la posición -3 se también se pueden encontrar residuos más grandes como valina, treonina, leucina e isoleucina [225].

Figura 18

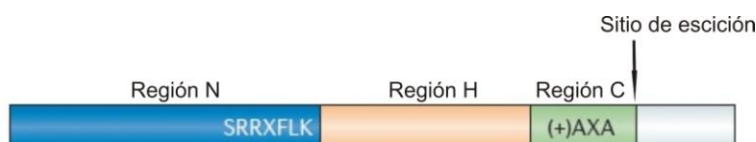


Figura 18. Representación esquemática de la estructura típica del péptido señal del sistema Tat. AXA representa el sitio de reconocimiento de la peptidasa. La figura no se encuentra a escala.

Luego de la traslocación de la proteína, mediada por el componente TatA, la región C del péptido señal queda del lado extra citoplasmático (unida al complejo TatB-TatC) siendo reconocida y clivada por la peptidasa liberando la proteína plegada de la membrana plasmática [226].

Resultados

Producción y secreción de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*

Análisis sistemático de secuencias señales del sistema Tat

Actualmente los rendimientos más elevados de producción de proteínas recombinantes secretadas en *C. glutamicum* fueron obtenidos a partir de péptidos señales que utilizan el sistema Tat [118, 120]. En esta etapa del trabajo, se

aprovecharon las características que brinda la plataforma pTGR, para estudiar y clasificar secuencias para las cuales están descritas hasta el momento las mayores eficiencias de secreción en esta especie. Entre ellas se encuentran las correspondientes a las proteínas TorA (de *E. coli*); PhoD (de *C. glutamicum*); PhoD (de *B. subtilis*) y cgc0949 (de *C. glutamicum*) [111, 120, 126, 227].

Para lograr este objetivo inicialmente se insertó, entre los sitios *NdeI* y *EcoRI* del vector pTGR5, un fragmento sintético que contiene ORF de la proteína fluorescente mCherry para obtener el vector pTGR18. El pTGR5, que contiene al promotor *tac* y RBS *sod*, fue elegido en base a los experimentos previos que demostraron la expresión más alta del gen reportero eGFP.

Luego se amplificaron las distintas secuencias señales y se agregaron, mediante el uso de oligonucleótidos degenerados y reacciones de PCR, los sitios *NdeI* en la región 5' y *Asel* en la región 3'. Finalmente, aprovechando los extremos cohesivos de estos sitios, se clonaron en el *NdeI* del plásmido pTGR18 para obtener los plásmidos pTGR19, pTGR20, pTGR21 y pTGR22 (Figura 19 y Tabla 5).

Figura 19

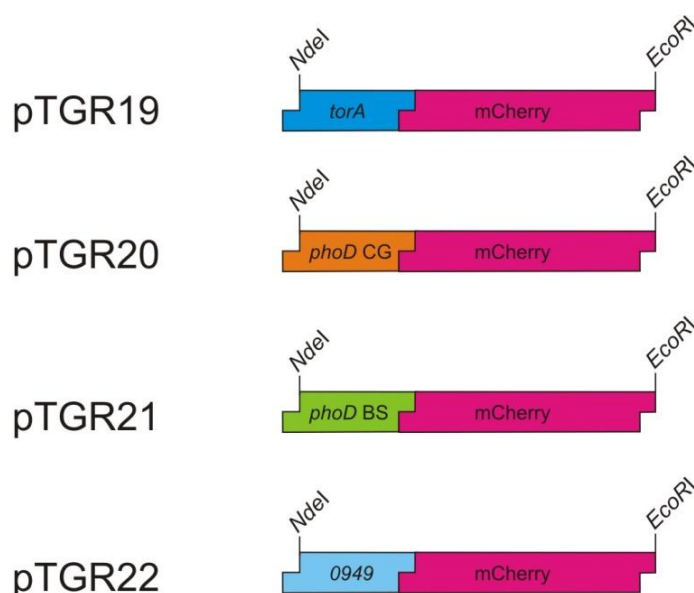
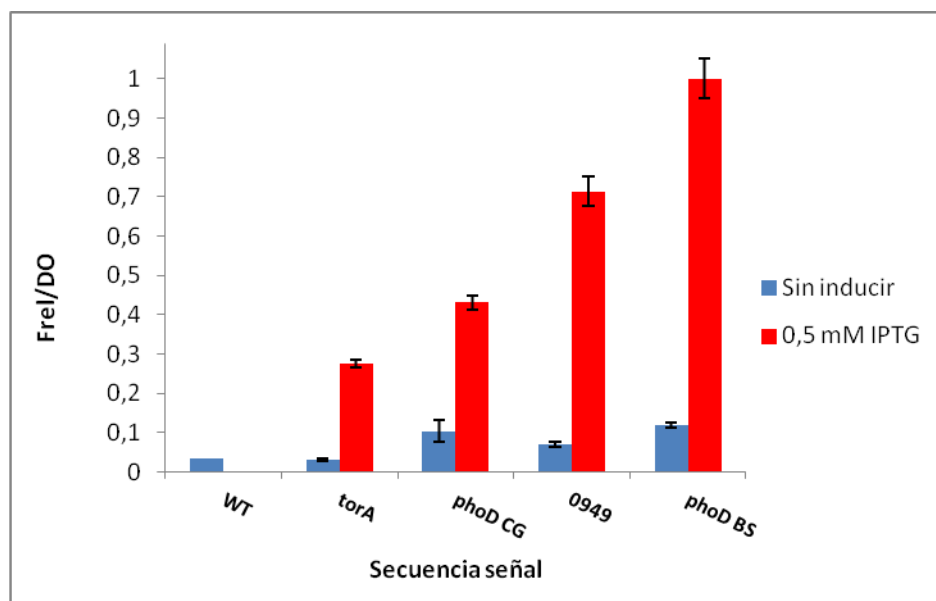


Figura 19. Representación esquemática de las construcciones obtenidas para la secreción de la proteína reportera mCherry utilizando distintos péptidos señales del sistema Tat. La figura no se encuentra a escala.

A partir de los vectores obtenidos, se transformó *C. glutamicum* y se midió emisión de fluorescencia en los sobrenadantes de cultivos luego de 24 hs de inducción con IPTG 0,5 mM. Como se puede observar en la Figura 20A, los distintos péptidos señales demostraron eficiencias variables para la secreción de mCherry, siendo la más alta la correspondiente a la construcción que contiene al péptido de la proteína PhoD de *B. subtilis*. Luego, con el objetivo de determinar si la secreción se veía afectada con el paso del tiempo, a partir de la cepa con la secuencia de PhoDBS, se midió fluorescencia en el sobrenadante cada 24hs. Como se puede observar en la Figura 20B, la misma permanece prácticamente invariable hasta las 72hs luego de las cuales decae ligeramente. Mediante una cuantificación densitométrica, utilizando el software GelPro Analyzer, se determinó que la cantidad de mCherry en el sobrenadante de *C. glutamicum* luego de 24h de inducción es de 0,09 g/L.

Figura 20

A



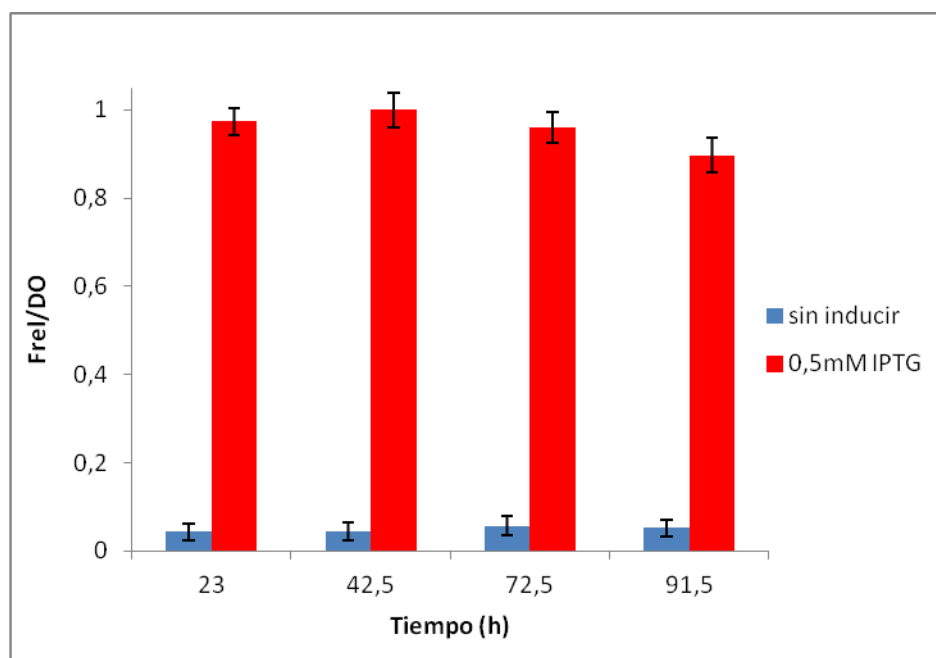
B

Figura 20. Medida de fluorescencia relativa de mCherry en sobrenadantes de cultivos de *C. glutamicum* utilizando distintos péptidos señal del sistema Tat (A) y a distintos tiempos para la construcción que contiene el péptido señal de PhoDBS (B). Los gráficos representan la proporción de fluorescencia relativa de mCherry normalizada respecto a la densidad óptica de los cultivos medida a 600nm.

Sobreexpresión de la maquinaria del sistema Tat

Trabajos previos han reportado que la sobreexpresión de las proteínas TatA, TatB y TatC aumenta significativamente los niveles de secreción de la enzima transglutaminasa en *C. glutamicum* [120]. Sin embargo, la expresión de estos traslocadores fue realizada utilizando plásmidos diferentes con orígenes de replicación compatibles, lo cual desde el punto de vista práctico presenta una desventaja ya que es necesaria la presencia de más de un antibiótico para mantener la presión selectiva. En esta etapa el objetivo fue utilizar las ventajas previamente desarrolladas para la expresión simultánea de genes, con el fin de sobreexpresar toda la maquinaria de la vía Tat desde un mismo plásmido. Para lograr esta meta en primer lugar se clonó un fragmento de ADN sintético que contiene al gen *tatB* de *C. glutamicum* bajo control de su propio promotor en el sitio *SpeI* del pTGR21 para obtener el pTGR24. Luego se clonó un segundo inserto, que

contiene a los genes *tatA* y *tatC* como un operón, también bajo control de su propio promotor, en el sitio *AvrII* del pTGR24 para obtener el pTGR25 (Tabla 5).

Posteriormente se transformaron estos plásmidos en *C. glutamicum* y se realizaron los mismos ensayos descritos previamente para determinar el efecto de estas construcciones sobre la secreción de mCherry. Como se puede observar en la Figura 21, la sobreexpresión de todos los traslocadores del sistema Tat aumenta la secreción de mCherry un 25% con respecto a la construcción original y a la que contiene sólo a TatB.

Figura 21

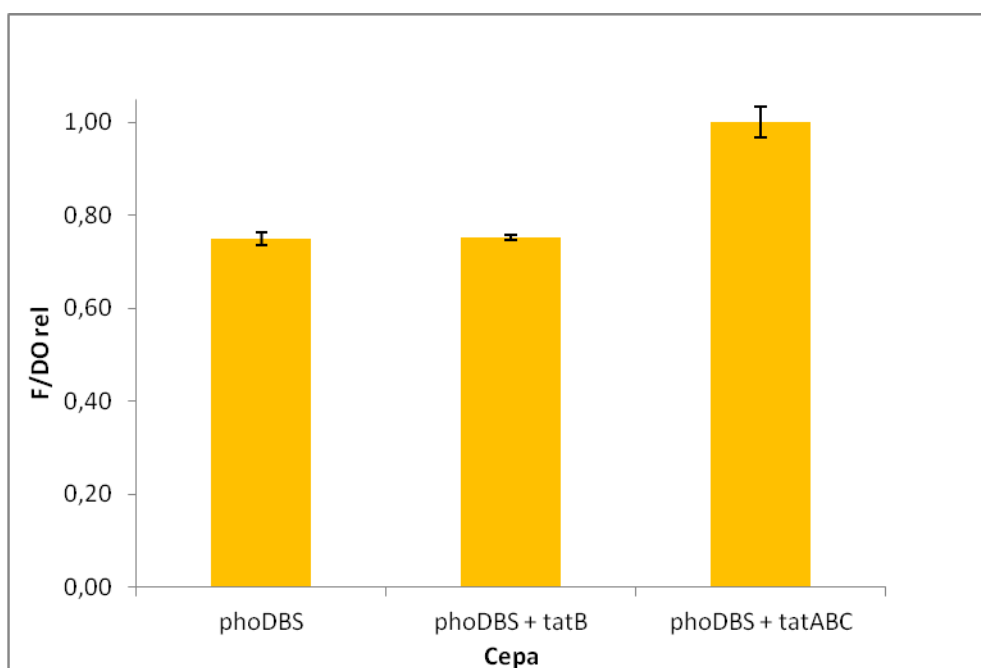


Figura 21. Medida de fluorescencia relativa de mCherry en sobrenadantes de cultivos de *C. glutamicum* que sobre-expresan el sistema Tat. El gráfico representa la proporción de fluorescencia relativa mCherry normalizada respecto a la densidad óptica de los cultivos medida a 600nm.

A continuación se sonicaron los cultivos y se analizaron por separación en geles de poliacrilamida los sobrenadantes y las fracciones solubles e insolubles del pellet celular. En la Figura 22 se puede observar que prácticamente no se detecta proteína recombinante intracelular cuando se sobre-expresan Tat A, B y

C (calle 4) y no así cuando sólo se encuentra TatB (calle 7), indicando que la producción de estos traslocadores podría ser limitante en la eficiencia de secreción.

Figura 22

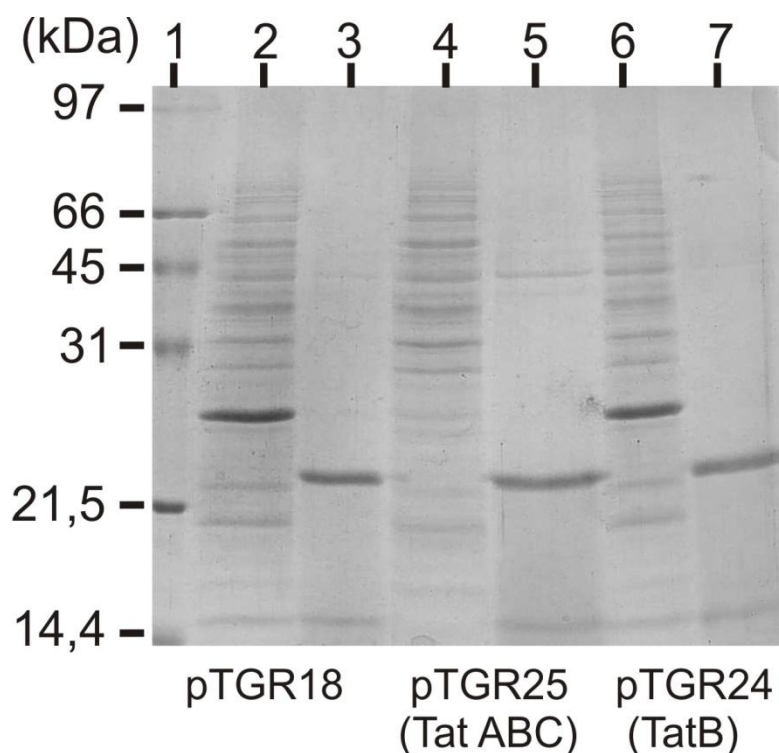


Figura 22. Secreción de mCherry en cultivos de *C. glutamicum*. SDS-PAGE de los pellet y sobrenadantes de cultivos de *C. glutamicum* pTGR18 (calles 2 y 3), pTGR25 (calles 4 y 5), pTGR24 (calles 6 y 7). Marcador de peso molecular (calle 1).

Finalmente se realizó una cuantificación densitométrica (Figura 23), la cual demuestra que la proporción de proteína recombinante secretada, comparada con su contraparte intracelular, es aproximadamente un 95% superior en la construcción que sobre-expresa todos los componentes esenciales de la vía Tat. De esta manera queda demostrado que la propiedad que tiene el pTGR para expresar múltiples unidades transcripcionales puede ser aprovechada también para aumentar la eficiencia de secreción de proteínas recombinantes por medio de la co-expresión de proteínas accesorias.

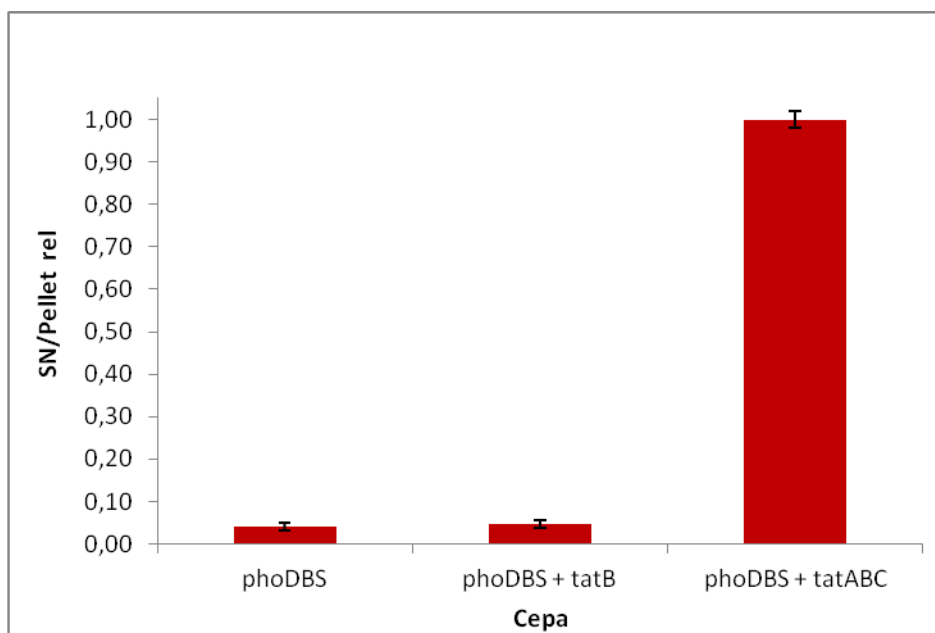
Figura 23

Figura 23. Sobre-expresión de los traslocadores del sistema Tat en *C. glutamicum*. Proporción relativa de las cantidades de mCherry en el sobrenadante normalizada respecto al pellet de cultivos.

Producción de proteínas de interés industrial

Con el objetivo de aprovechar el desarrollo realizado hasta el momento con la plataforma pTGR para producir proteínas de interés industrial en *C. glutamicum*, se decidió utilizar este sistema para obtener un método de manufactura para la enzima Fosfolipasa C de *B. cereus* (PLC BC). Como fue mencionado previamente, esta PLC es capaz de degradar eficientemente PC y PE y su producción heteróloga, en un sistema robusto como el que presenta *C. glutamicum*, resulta de gran interés para el proceso de desgomado enzimático.

Particularmente, la PLC de *B. cereus* (BC-PLC) es sintetizada como una “pre proenzima” monomérica, la cual contiene una secuencia de secreción de 24 aminoácidos y un propéptido de 14 aminoácidos (Figura 24). Este último, una vez que la proteína ha sido liberada al espacio extracelular, es escindido para liberar la enzima madura de 245 aminoácidos y 28,5kDa de peso molecular aproximado. Luego de la proteólisis, un residuo de triptófano ocupa la posición amino terminal, el

cual resulta estrictamente necesario para obtener la enzima activa ya que se encuentra involucrado en la coordinación del cofactor zinc [228].

Figura 24

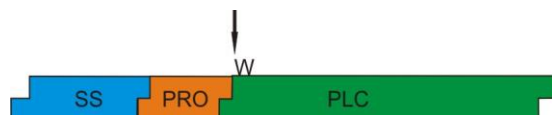


Figura 24. Representación esquemática de la secuencia de la PLC BC. La flecha indica en sitio de escisión del propéptido. “W” representa triptófano como primer aminoácido de la secuencia madura. SS y PRO representan la secuencia señal y la región del propéptido respectivamente. La figura no se encuentra a escala

Expresión y secreción de BC-PLC

Para desarrollar un proceso eficiente de producción y purificación de la BC-PLC en *C. glutamicum*, se decidió en la etapa inicial de este trabajo utilizar los resultados obtenidos con el fin de secretar esta enzima mediante la vía Tat.

Para llevar a cabo este objetivo usando como molde ADN genómico de *B. cereus*, se amplificó el marco abierto de lectura (ORF) que codifica para la Fosfolipasa C como una pre proenzima. Mediante el uso de oligonucleótidos degenerados se agregaron los sitios de restricción *Nde*I superpuesto con el codón de inicio (ATG) y *Avr*II inmediatamente después del codón del stop. Luego, mediante “overlapping PCR”, el péptido señal salvaje fue reemplazado por el de la proteína de la proteína PhoD de *B. subtilis*. Esta construcción fue clonada en el pTGR5 para obtener el pTGR26 (Figura 25).

Figura 25

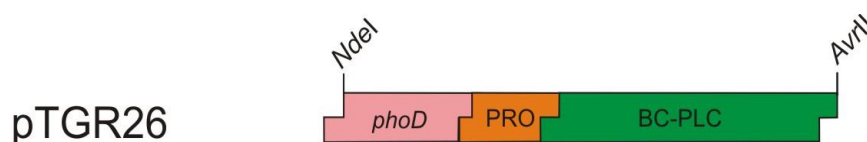


Figura 25. Representación esquemática de la construcción obtenida, utilizando el péptido señal de la proteína PhoD, para optimizar la secreción de BC-PLC. PRO indica la secuencia de 14 aminoácidos del propéptido. La figura no se encuentra a escala

Luego de transformar *C. glutamicum* el vector obtenido, se realizó un experimento de expresión y a las 24 h post inducción con IPTG 0,5mM se sonicaron los cultivos y se analizaron por separación en geles de poliacrilamida las fracciones solubles e insolubles del pellet celular. Como se puede observar en la Figura 26 (calle 2) es posible secretar BC-PLC a través del sistema Tat utilizando el péptido señal de la proteína PhoD. Sin embargo la eficiencia de este proceso es muy baja ya que, como demuestra la calle 1, la mayoría de la enzima se encuentra sin procesar en la fracción intracelular. A partir de una cuantificación densitométrica, se determinó que la cantidad de BC-PLC en el sobrenadante luego de 24 hs de cultivo corresponde a 0,015 g/L.

Figura 26

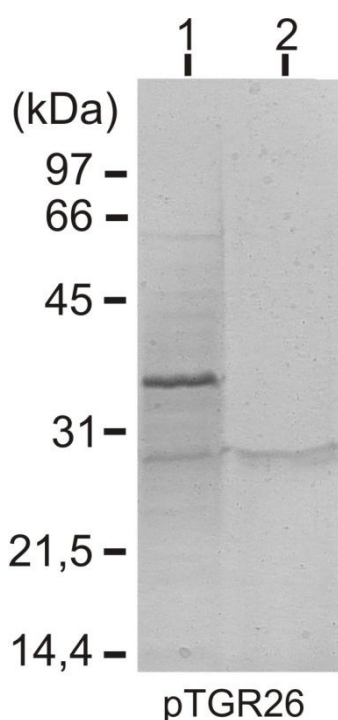


Figura 26. Expresión y secreción de BC-PLC desde el sistema Tat. Análisis mediante SDS-PAGE del pellet y sobrenadante del cultivo de *C. glutamicum* pTGR26

A partir de la pobre eficiencia de observada en el sobrenadante obtenido a partir del pTGR26, se decidió probar como alternativa para la exportación de esta enzima, la vía general de secreción Sec. Para ello, se ensayaron los péptidos señales de la secuencia salvaje de la BC-PLC y el de la proteína CspB de *C. glutamicum* para la cual se encuentran reportadas altas eficiencias de secreción

[115, 125, 127]. Para lograr este objetivo se obtuvieron dos nuevas construcciones. En primer lugar, partiendo de ADN genómico de *B. cereus*, se amplificó el (ORF) que codifica para la fosfolipasa C y se agregaron los sitios de restricción *NdeI* y *AvrII*. Luego, mediante “overlapping PCR”, el péptido señal salvaje fue reemplazado por el de la proteína CspB (Figura 27) y ambas construcciones fueron clonadas en el pTGR5 para obtener los vectores pTGR27 y pTGR28.

Figura 27

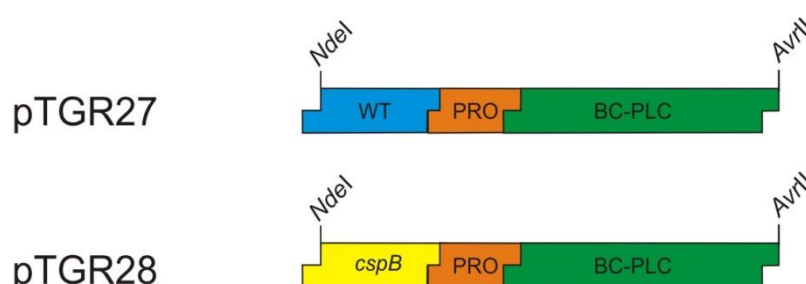


Figura 27. Representación esquemática de las construcciones obtenidas utilizando los péptidos señales de las proteínas CspB y salvaje, para optimizar la secreción de BC-PLC. PRO indica la secuencia de 14 aminoácidos del propéptido. La figura no se encuentra a escala.

Luego de transformar *C. glutamicum*, se realizó un experimento de expresión y luego de 24 h post inducción se analizaron nuevamente en un gel de poliacrilamida las fracciones solubles e insolubles del pellet celular. Como se puede observar en la Figura 28, es posible expresar y secretar BC-PLC utilizando las diferentes secuencias evaluadas. Por último, mediante una cuantificación densitométrica, se determinó que las eficiencias de secreción fueron 0,12 g/L y 0,11 g/L para los plásmidos pTGR27 y pTGR28 respectivamente. Demostrando que es posible, mediante el cambio de la secuencia señal, dirigir la secreción de BC-PLC a través del sistema Sec a partir del cual se obtiene una mayor eficiencia que mediante el sistema Tat.

Figura 28

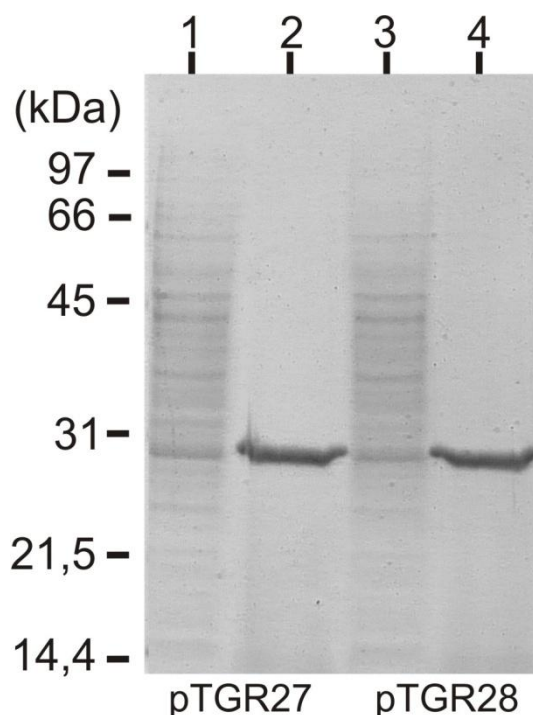


Figura 28. Expresión y secreción de BC-PLC desde el sistema Sec. Análisis mediante SDS-PAGE de los pellet y sobrenadantes de cultivos de *C. glutamicum* pTGR27 y pTGR28.

Determinación de la actividad PLC

La enzima obtenida en el sobrenadante de cultivo de la cepa que contiene al vector pTGR27 fue purificada mediante precipitación con sulfato de amonio y resuspendida en buffer acetato de sodio 20mM como se indica en Materiales y Métodos.

Para determinar si *C. glutamicum* es capaz de producir BC-PLC en su forma activa, se realizó un ensayo con el sustrato cromogénico específico ONPC. Para el mismo una mezcla de la enzima purificada con el sustrato a una concentración de 10 mM fue incubada a 50°C y luego de 30 minutos se corto la reacción con NaCO₃ según se indica en Materiales y métodos. Al ser hidrolizado, este sustrato desprende un grupo nitrofenilo, el cual absorbe a 405nm, cuando es escindido del resto de la molécula. Como se puede observar en la Figura 29, la BC-PLC obtenida en los cultivos de *C. glutamicum* carece de actividad. Este resultado permite concluir que aunque este microorganismo es capaz de procesar el péptido señal y secretar BC-

PLC con buena eficiencia, no es capaz de producirla en su forma activa. Como control positivo de este ensayo se utilizaron 0,5 μg de PLC comercial estándar.

Figura 29

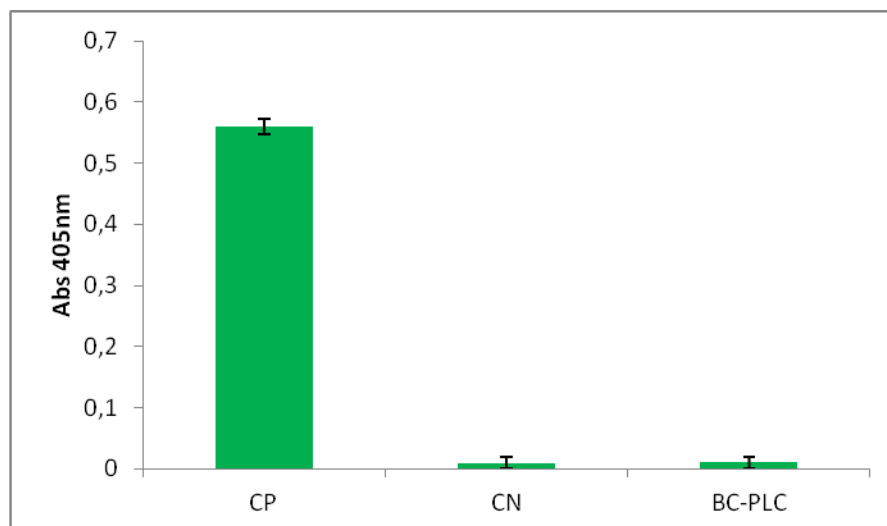


Figura 29. Determinación de actividad de BC-PLC. Ensayo de actividad fosfolipasa con el sustrato específico ONPC. BC-PLC indica la actividad de la purificación de un cultivo de *C. glutamicum* pTGR27. CP indica la actividad de control positivo donde se utilizaron 0,5 μg de PLC estándar. CN control negativo.

Secuenciación amino terminal y activación proteolítica

Previamente, ya ha sido reportado en la literatura el tratamiento con proteasas de la BC-PLC para producir la eliminación proteolítica del propéptido. Para ello se utilizan enzimas afines por residuos de arginina como tripsina, trombina o clostripaina como método para obtenerla en su forma activa [159, 229].

En función de estos resultados, a la preparación obtenida previamente, se le realizó un tratamiento con tripsina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y luego se envió para su secuenciación de la región amino terminal por el método de Edman. Como se observa en la Figura 30A, no fueron escindidos los aminoácidos correspondientes al propéptido en la enzima recombinante, lo cual coincide con las observaciones previas que indican que la presencia de un residuo de triptófano en el extremo amino terminal resulta esencial para la actividad de la BC-PLC [228, 230]. El mismo resultado se demuestra un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes

(Figura 30B), donde se observa que hay una pequeña diferencia en el peso molecular entre la enzima secretada y la tratada con proteasa. El tamaño predicho del propéptido, dado por el software Protein molecular weight calculator (<http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>), resulta en un peso aproximado de 1,6 kDa lo cual se refleja en la diferencia en la movilidad electroforética de las bandas observadas.

Figura 30

A



B

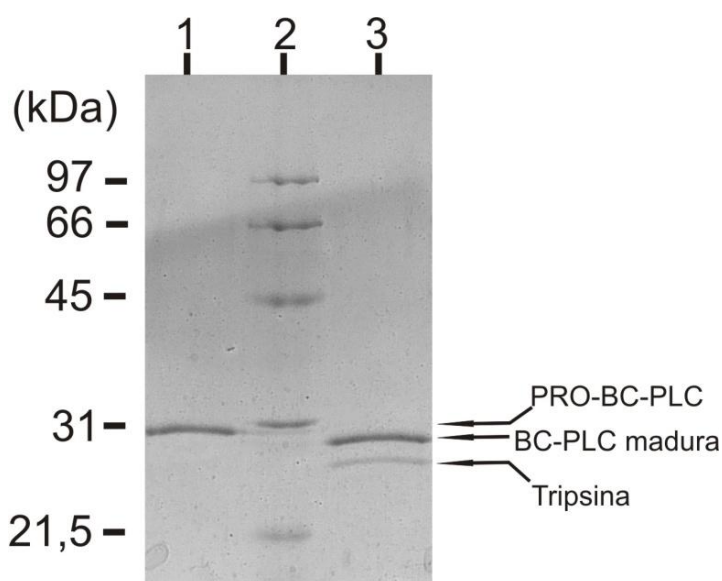


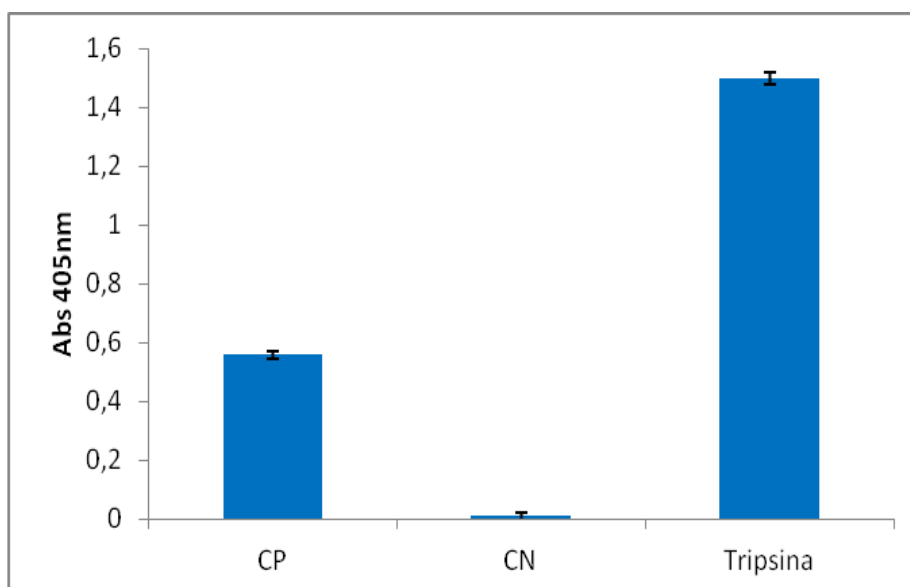
Figura 30. Activación proteolítica de la BC-PLC mediante el tratamiento con tripsina. (A) Secuenciación amino terminal obtenida por el método de Edman. Las líneas de punto indican la secuencia de aminoácidos obtenida para la PLC secretada y la doble línea indica a secuencia obtenida de la PLC luego del tratamiento con tripsina. Indicado con una flecha se encuentra el sitio de proteólisis de la tripsina. **(B)** SDS-PAGE de sobrenadantes de cultivos de *C. glutamicum* pTGR27. Calle 1 BC-PLC secretada. Calle 2 marcador de peso molecular. Calle 3 BC-PLC madura después del tratamiento con tripsina.

Luego se realizó nuevamente el ensayo utilizando el sustrato cromogénico y como se demuestra la Figura 31A, la enzima tratada con esta proteasa sí presentó actividad a diferencia de lo que se había observado previamente.

Por último y con el objetivo de caracterizar la enzima obtenida, se determinaron los parámetros cinéticos de la misma, K_m y V_{max} , así como la actividad específica a partir de muestras de la BC-PLC tratada con tripsina. Para ello se construyó una curva de actividad PLC en función del tiempo (Figura 31B), para la cual a diferencia del otro ensayo se incubó a 50°C la enzima tratada tripsina con el sustrato PNOPC a una concentración de 1 mM y se tomaron medidas sucesivas de absorbancia a 405 nm durante 1 h. Luego los datos obtenidos se ajustaron en función de la ecuación integrada de Michaelis-Menten para obtener los valores de V_{max}/K_m . Como se indica en la Tabla 4, la preparación obtenida de la BC-PLC recombinante en *C. glutamicum* se comporta de manera similar al estándar utilizado.

Figura 24

A



B

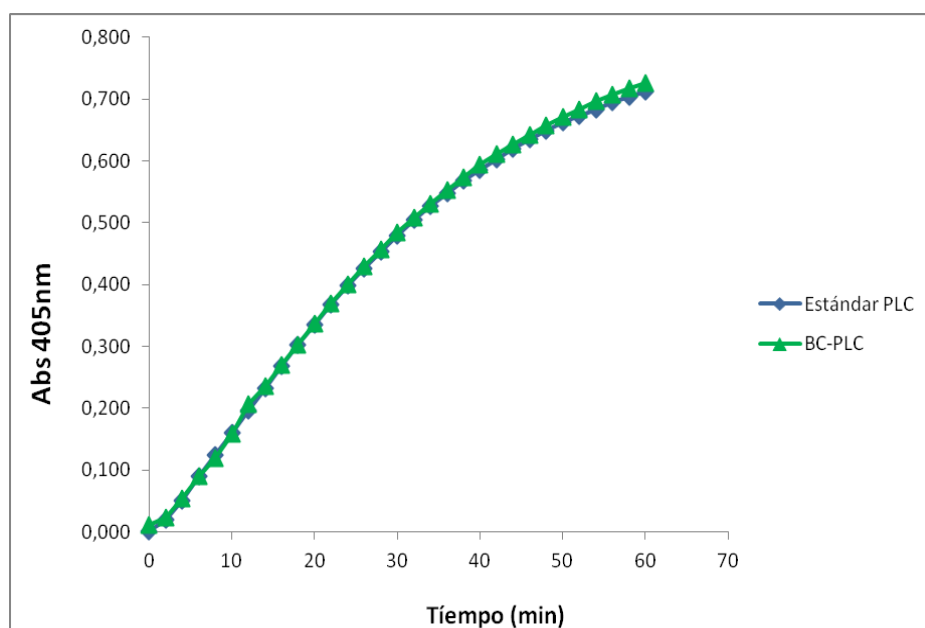


Figura 31. Determinación de actividad y parámetros cinéticos de BC-PLC. (A) Ensayo de actividad fosfolipasa con el sustrato específico ONPC. Tripsina indica la actividad de una purificación de un cultivo de *C. glutamicum* pTGR27 tratado con tripsina. CP indica la actividad de control positivo donde se utilizaron 0,5 μg de PLC estándar. CN indica control negativo. (B) Cinética de la reacción de BC-PLC tratada con tripsina durante 1 hora de reacción enzimática.

Tabla 4

| | PLC estándar | BC-PLC |
|------------------------|--------------|--------|
| V_{\max}/K_m (1/min) | 0.0170 | 0.0167 |
| U/mg | 195.1 | 194.2 |

Tabla 4. Parámetros cinéticos de BC-PLC vs estándar.

Optimización de la secuencia de la BC-PLC para la expresión en *C. glutamicum*

Una gran cantidad de factores tienen influencia sobre los niveles de expresión de proteínas recombinantes. Entre ellos la preferencia de codones del organismo

heterólogo, el contenido de G+C en su secuencia de ADN, la estructura secundaria y estabilidad del ARN mensajero [231-233]. Un parámetro frecuentemente utilizado al momento de realizar la optimización de una secuencia nucleotídica es el “índice de adaptación de codones” (CAI). Este último adquiere valores entre cero y uno e indica la desviación entre el uso de codones de un gen de interés y un grupo de codones utilizados como referencia, los cuales generalmente corresponden a los de los genes que más se expresan en un organismo. Dicho de otra manera, el grado en que el uso de codones de una secuencia se adapta a las frecuencias de uso de codones calculadas previamente para un organismo. Un valor de CAI cercano a 1 significa una mayor proporción de los codones más abundantes [234, 235].

Para determinar el CAI de la PLC de *B. cereus*, se utilizó la herramienta computacional “CAI calculator” [236], la cual reflejó un valor de 0.59 cuando se comparó con la frecuencia de uso de *C. glutamicum* descrita previamente [237].

A partir de estos resultados y con el objetivo de aumentar el rendimiento en la producción y secreción de BC-PLC, se realizó la optimización de la secuencia para su expresión en *C. glutamicum* utilizando el software libre Optimizer [238]. Esta plataforma, a partir de una secuencia de aminoácidos, obtiene una secuencia de ADN en donde el uso de codones es optimizado para la expresión en el organismo seleccionado. La estrategia de optimización en este caso consistió en asignar al azar un codón para cada aminoácido en donde la probabilidad de cada triplete se encuentra basada en una tabla de preferencias reportada para esta especie [237]. A partir de esta estrategia, se obtuvo una secuencia con un CAI de 0.9 la cual se encargó para la síntesis a la compañía especializada Genscript. La misma, se clonó posteriormente entre los sitios *NdeI* y *AvrII* del vector pTGR5 para obtener el pTGR29. A partir de este vector se transformó *C. glutamicum*, se realizó un experimento de expresión y 24hs después de la inducción con IPTG 0,5 mM se sembró en un gel de poliacrilamida el sobrenadante del cultivo. Como se puede observar en la Figura 32 la cantidad de PLC secretada a partir del plásmido con la secuencia optimizada no superó a la que se realizó desde la secuencia salvaje de *B. cereus* utilizada como control. Mediante una cuantificación densitométrica se determinó que la eficiencia de secreción para el pTGR27 es 2 veces superior con respecto al pTGR29

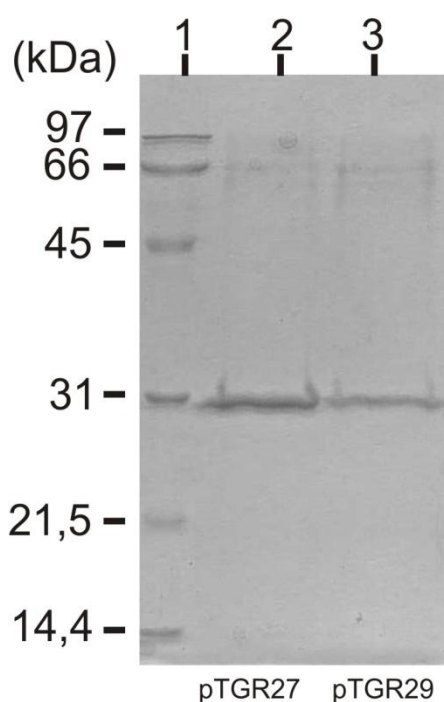
Figura 32

Figura 32. Expresión de BC-PLC a partir de la secuencia salvaje vs la secuencia optimizada para *C. glutamicum*. Calle 1 marcador de peso molecular. Calle 2 sobrenadante pTGR27; calle 3 sobrenadante pTGR29.

Finalmente se realizó un ensayo de actividad, utilizando el sustrato cromogénico PNOPC, con una purificación obtenida a partir de sobrenadantes de cultivos transformados con pTGR29, la cual fue tratada con tripsina. Como se puede observar en la Figura 33, la purificación proveniente del plásmido pTGR27 tiene el doble de actividad que la obtenida a partir del pTGR29, lo cual coincide con los niveles de secreción demostrados en el gel de poliacrilamida.

Figura 33

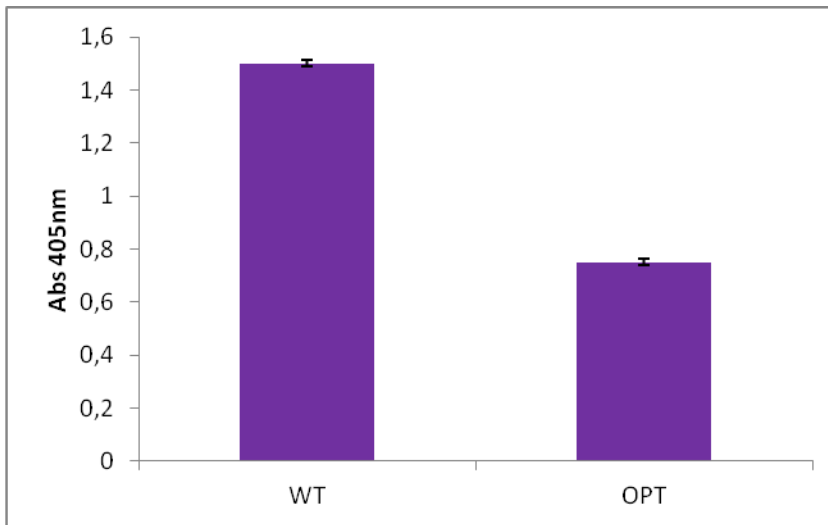


Figura 33. Ensayo de actividad fosfolipasa con el sustrato específico ONPC. Purificaciones obtenidas a partir de sobrenadante de cultivos de *C. glutamicum* pTGR27 (WT) y pTGR29 (OPT).

Tabla 5

| Plásmido | Replicón | Promotor | RBS | Gen | Sec señal |
|----------|----------|------------|------------|-------------------------|----------------|
| pTGR18 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry</i> | - |
| pTGR19 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry</i> | <i>torA</i> |
| pTGR20 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry</i> | <i>phoD</i> CG |
| pTGR21 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry</i> | <i>phoD</i> BS |
| pTGR23 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry</i> | 0949 |
| pTGR24 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry/ tatB</i> | <i>phoD</i> BS |
| pTGR25 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>mCherry/ tat ABC</i> | <i>phoD</i> BS |
| pTGR26 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>plc</i> | <i>phoD</i> BS |
| pTGR27 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>plc</i> | <i>plc</i> |
| pTGR28 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>plc</i> | <i>cspB</i> |
| pTGR29 | pGA1 | <i>tac</i> | <i>sod</i> | <i>plc</i> OPT | Salvaje OPT |

Tabla 5. Serie de plásmidos derivados del pTGR obtenidos en esta parte del trabajo

Discusión

Desde los años 50 que fue descubierto como un organismo productor de ácido glutámico natural, *C. glutamicum* se ha transformado en el organismo más importante en la industria biotecnológica para la producción de aminoácidos. Más de dos millones de toneladas de lisina y ácido glutámico, entre otros, son producidos anualmente mediante esta especie los cuales son utilizados en mayormente en la industria alimenticia [16]. Por otro lado además de las los atributos que presenta para la obtención de este tipo de compuestos, características fundamentales como la ausencia de actividad proteolítica extracelular, hicieron desde hace ya varios años a esta especie más que interesante para la producción de proteínas heterólogas [108, 110, 111].

Actualmente, una gran variedad de enzimas recombinantes, son comercializadas como productos esenciales en la mayoría de las industrias como la farmacéutica, cosmética, alimenticia y energética [239, 240]. Es por ello que resulta necesario el desarrollo de procesos rentables ante una necesidad creciente de este tipo de productos. Para ello la obtención de proteínas de secreción resulta una de las opciones más atractiva en los procesos de producción a gran escala, ya que la simplificación de los pasos de purificación, tiene un impacto significativo en el costo final de los productos obtenidos. Diversos factores, además de la optimización de los péptidos señales, resultan determinantes sobre la eficiencia de secreción de enzimas recombinantes en organismos heterólogos [241]. Para optimizar niveles de expresión, resulta esencial recurrir a tecnologías que permitan ensayar de manera rápida y eficiente distintos elementos regulatorios así como la modulación de los niveles de los componentes de una vía metabólica [242]. En este sentido, la plataforma pTGR contribuye a la exploración de partes involucradas en la expresión génica y facilita el rápido ensamblado de circuitos genéticos los cuales permiten realizar ingeniería metabólica en *C. glutamicum*, brindando la tecnología necesaria para desarrollar cepas modificadas capaces de producir enzimas de interés industrial.

El desgomado enzimático es un proceso amigable con el medio ambiente el cual está reemplazando rápidamente al método tradicional de desgomado acuoso. En Argentina, actualmente se producen aproximadamente 8 millones de toneladas de aceite de soja por año. De ellas sólo 1.4 millones, las cuales representan cerca

de 4300 toneladas diarias, son refinadas mediante desgomado enzimático. Por lo tanto, hay una necesidad emergente de desarrollar nuevos procesos con el fin obtener enzimas capaces de remover de manera eficiente las “gomas” presentes en aceites vegetales crudos. Actualmente las enzimas preferidas para realizar este procedimiento son las PLCs, las mismas son capaces de degradar los fosfolípidos en DAGs los cuales resultan miscibles en el aceite dando como resultado un rendimiento extra.

En mamíferos, distintas enzimas con actividad PLC juegan un rol fundamental en las funciones regulatorias de la vías de transducción de señal celular, adonde el DAG generado funciona como activador hidrofóbico de kinasas [243]. Dado que la PLC de *B. cereus* ha sido una enzima ampliamente estudiada como modelo para su homóloga en mamíferos [244-247], resulta una candidata muy atractiva para su producción en organismos heterólogos a fin de utilizarla posteriormente en procesos de desgomado enzimático. Con el objetivo de extender la plataforma pTGR previamente obtenida hacia el desarrollo de cepas productoras de enzimas de interés industrial, se decidió evaluar la posibilidad de producir y secretar BC-PLC en *C. glutamicum*.

En esta especie, varios grupos de trabajo han reportado el uso de péptidos señales del sistema Tat para secretar proteínas recombinantes [120, 126, 227]. Además de la elección del organismo productor, la comparación entre diferentes secuencias señales de secreción, es un paso importante en lo que concierne a la puesta a punto y optimización de un proceso de producción de proteínas en sistemas heterólogos [115, 126]. En este sentido, utilizando la plataforma que provee el vector pTGR como sistema de prueba, se evaluaron las eficiencias de distintas secuencias reportadas que utilizan la vía Tat en *C. glutamicum*. Los resultados indicaron que la correspondiente a la proteína PhoD de *B. subtilis* resultó la más eficaz al momento de secretar el gen reportero mCherry, obteniéndose hasta 0,09g/L en sobrenadantes de cultivos en batch. Por otro lado también se encuentra descrito que la sobreexpresión de los genes esenciales de la vía Tat en esta especie aumenta significativamente los niveles de secreción de proteínas [120]. En este capítulo, quedó demostrado que el desarrollo realizado previamente con el vector pTGR para la expresión simultánea de genes, también se puede aplicar para aumentar el rendimiento de secreción de proteínas recombinantes. La sobreexpresión desde el mismo plásmido, de los traslocadores TatA, TatB, TatC

demostró un aumento en los niveles de fluorescencia de mCherry en sobrenadantes de cultivos. Este resultado se encuentra estrictamente relacionado con una disminución en la proteína retenida en la fracción intracelular, indicando que el proceso de exportación mediante el sistema Tat en *C. glutamicum*, se encuentra limitado por la cantidad de traslocadores disponibles en la membrana celular.

Aprovechando las ventajas que presenta la plataforma pTGR, se utilizó el péptido señal de la proteína PhoD de *B. subtilis* para obtener una cepa que produzca BC-PLC como proteína de secreción facilitando su purificación en un futuro proceso producción industrial. Sin embargo, a diferencia de lo esperado, la eficiencia de secreción fue muy baja, quedando la mayor proporción de la misma en el interior celular. En algunos casos, se ha mencionado que la saturación de los sistemas de expresión en organismos heterólogos, puede causar que una fracción de las proteínas producidas no alcance su conformación nativa [248]. Por otro lado, también se encuentra descrito que la proporción de proteína desnaturalizada puede afectar el rendimiento en el proceso de secreción [249]. Particularmente en la vía Tat, existe un control de calidad intrínseco que monitorea el correcto plegamiento de las proteínas antes de ser traslocadas y excluye las que no han adquirido la correcta conformación pudiendo ser una de las hipótesis que explique los resultados observados [250].

Desde otro punto de vista, la sobreexpresión de proteínas de secreción puede causar el atasco de las mismas en la membrana debido a escasez de los componentes del traslocón [251]. En función de esto, una sobrecarga de los componentes del sistema Tat, podría ser otra posible explicación ante la imposibilidad de la BC-PLC para atravesar la membrana celular. Por último, dependiendo la especie, la estructura de la pared celular puede tener una fuerte influencia en la localización durante el proceso exportación. La interacción entre las proteínas recombinantes y los componentes de la misma podrían evitar en algunos casos la liberación al medio extracelular [126, 252].

Con el fin de buscar alternativas con mayor eficiencia, se ensayaron la secuencia señal salvaje de esta enzima y la de la proteínas CspB de *C. glutamicum* [115, 127] la cuales utilizan la vía general de secreción Sec. La eficiencia obtenida desde el plásmido que contiene la secuencia de CspB, resultó cercana a la obtenida desde la salvaje de *B. cereus* y estas cantidades fueron a su vez aproximadamente ocho veces superiores a la secretada desde la secuencia de la proteína PhoD. Estos

resultados, indican que es posible dirigir la secreción en función del péptido señal utilizado y que además la vía Sec sería la preferida para la exportación de BC-PLC en este organismo. Esto último no resultaría sorprendente ya que la misma vía de secreción es utilizada naturalmente por *B. cereus*. Aunque un estudio funcional de los componentes del sistema Sec no fue realizado todavía para *C. glutamicum*, recientemente se ha descrito la sobre-expresión sistemática no sólo de los traslocadores sino también de cada una de las proteínas involucradas en el proceso de secreción en el organismo emparentado *B. subtilis* [251, 253]. Estos resultados podrían facilitar la búsqueda de herramientas para la optimización del proceso de producción de BC-PLC en *C. glutamicum* en un trabajo futuro.

Si bien esta enzima pudo ser secretada con buena eficiencia desde diferentes secuencias señales, el agregado de tripsina para escindir el propéptido fue estrictamente necesario para la obtención la enzima madura activa. Para *B. cereus* los mecanismos naturales por el cual el propéptido es removido no han sido descritos. Sin embargo, para una PLC homóloga del microorganismo relacionado *Listeria monocytogenes*, fue encontrada una metaloproteasa extracelular involucrada en la proteólisis de este fragmento [254, 255]. La ausencia de una proteasa homóloga en *C. glutamicum* podría explicar incapacidad esta de especie para procesar correctamente la BC-PLC. Una limitación similar fue descrita previamente por otros grupos de trabajo para la producción de transglutaminasa la cual se produce también como una pre-proenzima. Como solución a esta problemática, co-expresaron una proteasa que les permitió obtener la enzima secretada en su forma activa [256].

La optimización de la secuencia de la PLC-BC para su expresión en *C. glutamicum* no reflejó, a diferencia de lo esperado, un aumento en la cantidad de enzima secretada. Generalmente las mutaciones sinónimas no alteran la estructura ni función de una proteína, sin embargo, pueden influir de diversas maneras sobre la expresión génica en un sistema heterólogo. Muchas veces no existe una correlación entre los niveles de expresión y el uso de codones ya que la modificación de este último también influye sobre diversos factores como la cantidad, estructura y estabilidad del RNA mensajero así como en la velocidad crecimiento del huésped [257]. Aunque un valor alto de CAI promueve una fuerte expresión, esta aproximación no tiene en cuenta la potencial contribución de los codones raros en el proceso de plegamiento que ocurre en simultáneo con la traducción o las

interacciones que puede tener el péptido naciente con chaperonas moleculares [258]. Por otro lado en este trabajo sólo se encargó la síntesis de un único resultado de los posibles que brinda el software Optimizer y para obtener una conclusión estadísticamente significativa acerca del éxito este programa como herramienta de optimización para la BC-PLC se deberían haber ensayado un número mayor de secuencias. Probablemente considerar sólo la optimización del CAI y no realizar una exploración sistemática de los diferentes factores involucrados en el proceso de producción de proteínas, no resulte la mejor opción para la optimización de la expresión de esta enzima en *C. glutamicum*. En algunos casos se encuentra descrito que la iniciación de la traducción y no el proceso de la elongación, resulta limitante sobre los niveles de expresión de una proteína recombinante [259-261]. Es por esto que el diseño de una secuencia que conduzca a una traducción uniformemente rápida puede no resultar la opción más eficaz [262, 263].

Aunque actualmente existan una gran cantidad de herramientas computacionales que permiten la optimización de múltiples parámetros en el diseño de genes, todas tienen sus limitaciones y hasta el momento ninguna brinda la posibilidad de analizar todos los factores en forma simultánea y proveer una secuencia única que garantice el máximo nivel de expresión [264]. Por lo tanto la variedad de secuencias optimizadas posibles que se obtendrían al utilizar todas las herramientas en forma separada, requeriría de una elevada cantidad de experimentos.

Capitulo 3

Introducción

El cultivo de alta densidad de microorganismos utilizando procesos de lote alimentado (Fed-batch) es la estrategia preferida a nivel industrial para aumentar la productividad volumétrica de productos bacterianos tales como aminoácidos y proteínas. El aspecto sobresaliente de este tipo de procesos es la alimentación continua con un sustrato en cantidades limitantes, generalmente la fuente de carbono, lo cual permite controlar la velocidad de crecimiento. Este tipo de régimen de alimentación evita problemas asociados con la inhibición del crecimiento, limitación de oxígeno y generación de calor que pueden ocurrir durante un proceso de batch en donde la disponibilidad de fuente de carbono es ilimitada [265]. En muchos casos los nutrientes utilizados para el crecimiento de microorganismos, como es el metanol para las fermentaciones de *P. pastoris*, pueden inhibir el crecimiento o resultar tóxicos a menos que se encuentren a concentraciones muy bajas. Por otro lado, en organismos como *E. coli* un exceso de fuentes de carbono que sean rápidamente metabolizadas, como glucosa, genera una disminución en la concentración de AMP cíclico intracelular lo cual puede causar una represión en los promotores sensibles al mismo. Ambos fenómenos pueden ser evitados mediante el uso de estrategias de Fed batch, en donde la velocidad de crecimiento se encuentra limitada mediante el control del flujo de alimentación, permitiendo la síntesis de productos deseados. Por último mediante el uso de esta estrategia, también se pueden evitar concentraciones tóxicas de subproductos que pueden tener consecuencias drásticas en los procesos de fermentación. En especies como *E. coli* un exceso de glucosa genera una sobrecarga de las vías metabólicas, aun en condiciones aerobias, lo que deriva en la formación de acetato el cual resulta inhibitorio para el crecimiento a concentraciones cercanas a los 5 g/L [266].

Los procesos de Fed-batch, comienzan generalmente, con una primera etapa (en Batch) en donde se agrega una concentración inicial de nutrientes al biorreactor de manera que el microorganismo crezca a su máxima velocidad de crecimiento específica. Durante la misma se agregan sólo se agregan los gases como oxígeno, en caso que el metabolismo sea aerobio, y ácidos o bases para mantener el pH en un valor deseado. El crecimiento celular se detiene en el momento que se acaban los nutrientes, generalmente la fuente de carbono, ya que el resto se encuentran en

exceso para completar todo el proceso de fermentación. Luego en una segunda etapa, la fuente de carbono es agregada mediante flujos regulados para mantenerla en concentraciones limitantes y controlar la velocidad de crecimiento. Para esta fase pueden llevarse a cabo distintas estrategias de alimentación. Una primera posibilidad consiste en mantener el flujo constante en donde la velocidad de crecimiento específica va disminuyendo en el tiempo debido al aumento de volumen y densidad celular. Como segunda alternativa se puede emplear un aumento escalonado o gradual del flujo de alimentación. En esta última se pueden lograr velocidades mayores y un crecimiento exponencial si el aumento de flujo es proporcional a la biomasa. Este tipo de estrategia, tiene como ventaja que posibilita un crecimiento a una velocidad de crecimiento específica para la cual se puede minimizar la formación de subproductos y optimizar la obtención de compuestos deseados [267]. El flujo de alimentación que permite un crecimiento exponencial puede ser calculado a partir de una ecuación derivada de un balance de masa asumiendo un rendimiento constante del uso del sustrato (Ecuación 2) [45].

Ecuación 2

$$F = \frac{\mu X_0 V_0}{S_0 Y_{X/S}}$$

Ecuación 2. Ecuación que permite determinar del flujo de alimentación para matener un crecimiento exponencial en un proceso de Fed Batch. X_0 es la concentración de biomasa (g/L), V_0 es el volumen inicial del reactor (L), μ es la velocidad de crecimiento específica deseada (h^{-1}), S_0 es la concentración inicial de sustrato en la solución de alimentación (g/L) e $Y_{X/S}$ es el rendimiento del sustrato.

Resultados

Escalado de la producción de BC-PLC y desgomado enzimático

Desarrollo del proceso de producción de BC-PLC en cultivos de alta densidad

Con el objetivo de poner a punto un proceso de producción económicamente viable para BC-PLC en *C. glutamicum*, inicialmente se utilizó la cepa salvaje ATCC13869. El objetivo de esta parte del trabajo consistió en ensayar las condiciones de cultivo en una cepa sin ninguna modificación genética, demostrar

si resultaban eficientes para el crecimiento y luego trasladarlas a la cepa que contiene el plásmido pTGR27 para la producción de la fosfolipasa recombinante.

La fermentación fue realizada en un reactor de 2 litros, utilizando un medio semi-definido con glucosa como fuente de carbono. Inicialmente se realizó una etapa de batch donde se agregó la misma a una concentración de 10 g/L. Una vez concluida esta fase, se calculó el valor de la velocidad de crecimiento específica máxima (Tabla 6) y se comenzó con la fase de alimentación. Durante esta última el flujo de alimentación se fue incrementando, según la ecuación 2, de manera de lograr un crecimiento exponencial a una velocidad igual a la mitad de la velocidad máxima calculada previamente en un valor de 0.4 h^{-1} ... Una vez iniciada la fase de inducción, la actividad metabólica de las células generalmente se encuentra influenciada por la expresión de la proteína recombinante [268]. Aplicar la misma estrategia con un perfil exponencial antes y después de la inducción puede llevar a una sobrealimentación que deriva en una merma tanto en el crecimiento como en la producción de proteínas [269]. En función de esto, una vez que el cultivo alcanzó una densidad óptica igual a 80, el flujo de alimentación se mantuvo constante a 10 mL de solución de alimentación por litro de cultivo hasta el final del proceso. En todos los puntos se determinó que la concentración de glucosa era igual a cero, indicando que la misma se encontraba en condiciones limitantes. Los parámetros obtenidos en esta fermentación demuestran que pudo obtener una concentración celular de 82 gPS/L, correspondiente a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (densidad óptica a 600nm) de 410 unidades, luego de 55 horas de cultivo (Tabla 6).

Luego, aplicando los mismos conceptos se realizó una fermentación con la cepa de *C. glutamicum* ATCC 13869 que contiene al plásmido pTGR27 con el fin de producir BC-PLC en cultivos de alta densidad. Nuevamente se inició el cultivo con una fase de batch con 10g/L de glucosa como fuente, seguido de una fase de Fed-batch con flujos calculados para lograr un crecimiento a la mitad de la velocidad de crecimiento específica máxima (0.3 h^{-1} en este caso). El cultivo creció hasta una DO_{600} igual 80, punto a partir del cual el flujo de alimentación se mantuvo constante como fue realizado previamente para la cepa salvaje. En ese punto se agregó IPTG hasta una concentración final de 0,5mM para inducir la expresión de la BC-PLC. La Figura 34 demuestra el curso de la fermentación en donde se representan distintos parámetros como la DO_{600} , el porcentaje de oxígeno disuelto y la concentración de proteína secretada. Esta última, fue detectable 7 h luego de iniciada la fase de la

inducción y alcanzó una concentración promedio de 5.5 g/L luego de 55 h de proceso total. En la Tabla 6 se encuentran los parámetros de fermentación calculados para esta cepa. Los mismos demuestran que tanto los rendimientos como la velocidad de crecimiento específica resultan menores en comparación a la cepa salvaje, indicando que la replicación del plásmido o expresión de la BC-PLC podrían afectar de alguna manera el metabolismo de la misma.

Figura 34

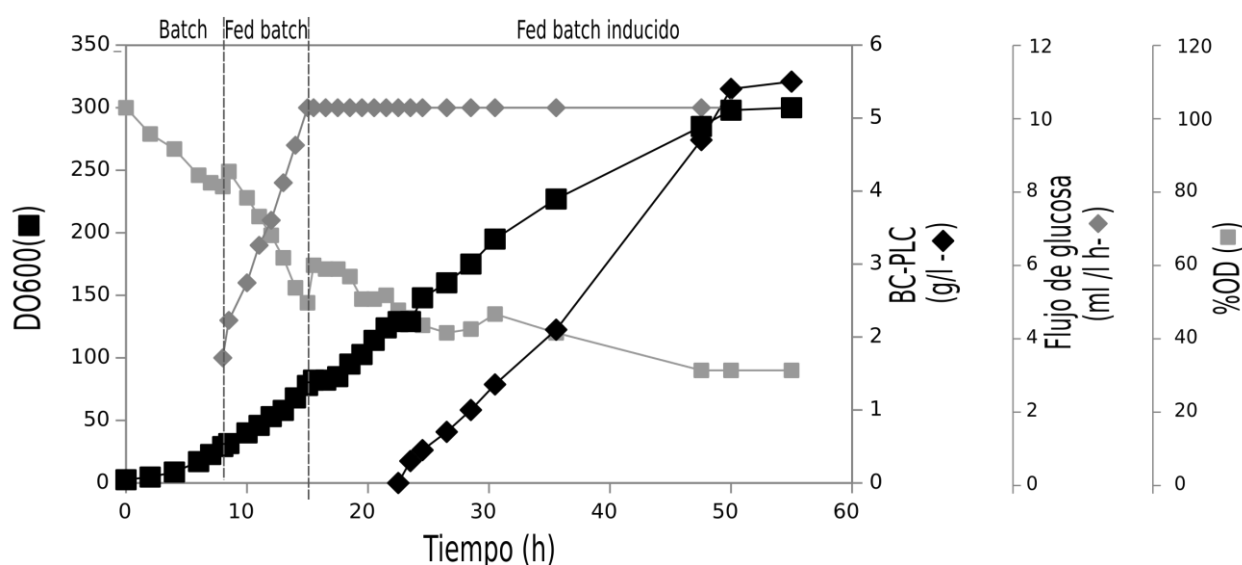


Figura 34. Cultivo de alta densidad de *C. glutamicum* para la expresión de BC-PLC. Concentración de BC-PLC secretada en función del tiempo (rombos negros), biomasa (cuadrados negros), flujo de glucosa (cuadrados grises) y oxígeno disuelto (rombos grises) durante el proceso de fermentación.

Tabla 6

| Cepa | DO _{600nm} alcanzada | Tiempo (h) | Velocidad de crecimiento específica (h ⁻¹) | Conc. celular (gPeso seco/L) | Y _{X/S} (g/g) | Y _{P/S} (g/g) | Productividad volumétrica (g/L.h) |
|--------|-------------------------------|------------|--|------------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| 13869 | 410 | 54,5 | 0.4 | 82 | 0.4 | - | - |
| pTGR27 | 300 | 55 | 0.3 | 60 | 0.25 | 0.022 | 0.1 |
| | | | | | | | |

Tabla 6. Parámetros calculados a partir de las fermentaciones realizadas

Desgomado enzimático a escala de laboratorio a partir de BC-PLC recombinante

Con el fin de evaluar la capacidad de la BC-PLC recombinante para el desgomado enzimático de aceite de soja, se realizaron reacciones a escalas de laboratorio imitando las condiciones utilizadas a escala industrial. Para ello inicialmente la enzima fue purificada y activada con tripsina como se describió previamente. Luego 5 mg de la misma se utilizaron para el tratamiento de 1 kg de aceite crudo de soja el cual contiene un 1,75% de fosfolípidos (aproximadamente 700 ppm de fosfato inorgánico). La mezcla fue emulsionada e incubada a una temperatura de 50°C la cual se encuentra descripta como la óptima para esta enzima [270]. La reacción fue monitoreada durante 3 h a partir de la determinación de la concentración de los DAGs generados mediante HPLC. La Figura 35 muestra que luego de 1.5 h la curva alcanza un plateau a una concentración de DAGs de 1.01% correspondiente a la cantidad esperada para la hidrólisis completa de PC y PE.

Figura 35

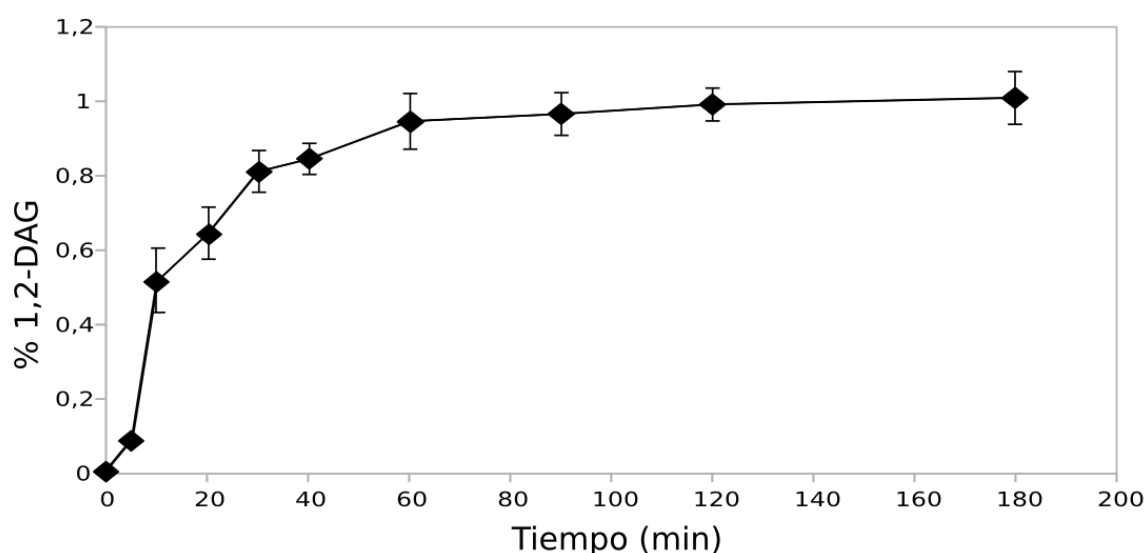


Figura 35. Análisis de la hidrólisis de fosfolípidos en aceite crudo de soja por la BC-PLC. Determinación de los DAGs generados mediante HPLC-ELSD de aceite tratado con BC- PLC recombinante a diferentes tiempos de reacción.

RMN de de aceite tratado con BC-PLC

Para confirmar la especificidad de la reacción, la fracción de fosfolípidos del aceite tratado fue extraída y analizada mediante resonancia magnética nuclear (RMN). La Figura 36 muestra el espectro de RMN para el aceite de soja tratado y un control en el cual la enzima no fue agregada. Se puede observar que luego del tratamiento los picos correspondientes a fosfatidil colina (PC) y fosfatidil etanolamina (PE) desaparecieron completamente y que se detectan los picos de fosfocolina (pCho) y fosfoetanolamina (pEth) los cuales son productos de la reacción. Estos resultados en conjunto con los del apartado anterior permiten concluir que la BC-PLC recombinante hidroliza completamente PC y PE para generar DAGs.

Figura 36

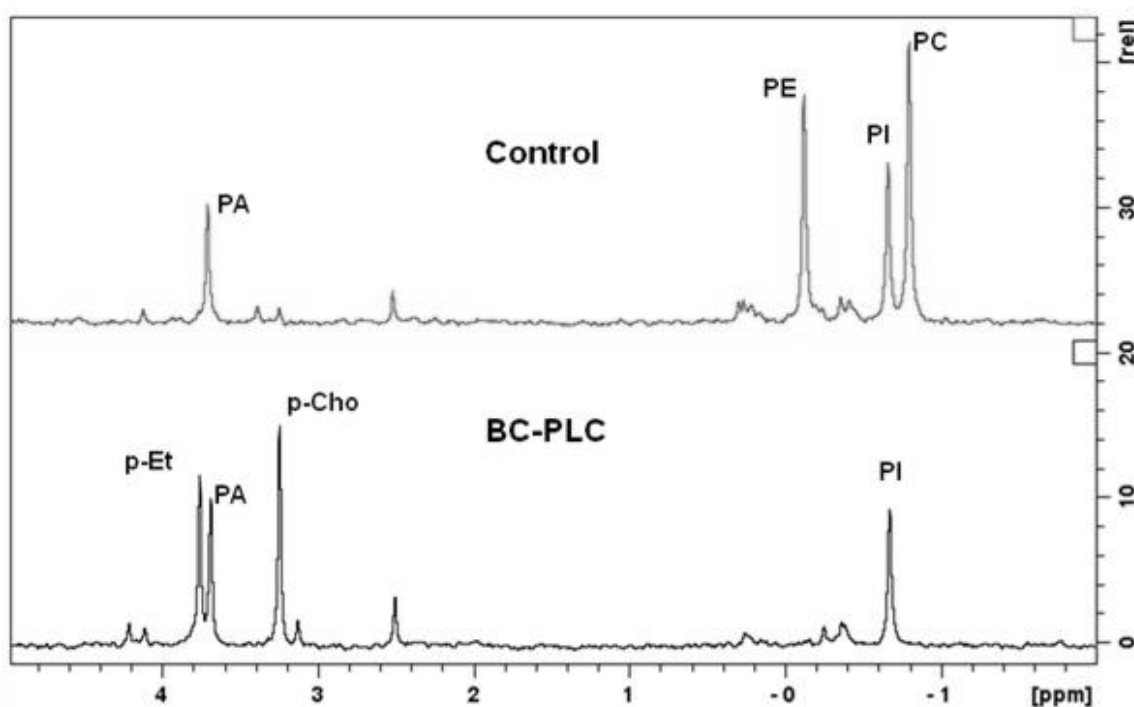


Figura 36. Tratamiento de aceite crudo de soja utilizando BC-PLC recombinante. La figura muestra un espectro de RMN de aceite tratado y sin tratar con la enzima BC-PLC recombinante obtenida a partir de la fermentación de *C. glutamicum*. PA indica ácido fosfatídico, PI fosfatidilinositol, PE fosfatidiletanolamina, PC fosfatidilcolina, p-Et fosfoetanolamina y p-Cho fosfocolina.

Discusión

La obtención de aminoácidos mediante fermentaciones de *C. glutamicum* es una tecnología desarrollada desde hace más de 50 años [15, 16] y la producción de proteínas fue reportada hace ya varias décadas [114]. Sin embargo, sólo en pocos casos se obtuvo una productividad de enzimas recombinantes lo suficientemente alta como para que el escalado del proceso sea rentable para la producción industrial. Enzimas como transglutaminasa, endoxilanasas, α -amilasa y anticuerpos de camello se encuentran entre los ejemplos en los que se lograron los valores aceptables de proteínas secretadas producidas por esta especie con títulos que no superan los 2 g/L [115, 116, 119, 120].

Por otro lado, los procesos descritos hasta el momento utilizan estrategias en donde la alimentación con la fuente de carbono se realiza en batch o alimentando de manera intermitente, es decir, variando la concentración de la misma entre valores que oscilan entre cero y un valor máximo generalmente cercano a 6 g/L durante todo el proceso [108, 119, 227, 271].

Uno de los problemas más frecuentes en las grandes escalas suele ser que la capacidad de mezclado se ve disminuida con el aumento del tamaño del reactor. Como generalmente los sustratos son agregados desde la parte superior del tanque y los gases desde la parte inferior, ante un mezclado ineficiente, se generan gradientes opuestos a lo largo del vaso del fermentador. Las células en la parte superior están expuestas a concentraciones excesivas de la fuente de carbono y simultáneamente sufren de la disponibilidad limitada de oxígeno. Por el contrario las que se encuentran en la parte inferior sufren de cantidades limitadas de fuente de carbono y excesivas de oxígeno disuelto en el medio de cultivo [272]. Un aumento de las concentraciones locales de la fuente de carbono produce regiones de sobre alimentación, que junto con otros factores como la agitación, resultan en aumentos de temperatura zonales. Combinado con una capacidad reducida de transporte y eliminación de dióxido de carbono, este aumento de temperatura así como la acumulación de metabolitos tóxicos derivan en condiciones de estrés para el organismo productor [273]. El paso cíclico por diferentes zonas de calentamiento y continua activación y desactivación de los genes de estrés puede conducir a

alteraciones fisiológicas, producidas por los cambios metabólicos, que tienen como efecto una reducción tanto en la velocidad de crecimiento como en la productividad de enzimas recombinantes [272, 274]. Por otro lado estos efectos también pueden causar daños en la membrana y problemas en la traslocación de proteínas [275].

Con el fin de minimizar estos fenómenos y obtener un proceso industrial económicamente viable para la manufactura de la BC-PLC, se evaluó un proceso de Fed-batch con una alimentación exponencial a partir de la cepa de *C. glutamicum* conteniendo el plásmido de expresión pTGR27. Utilizando un medio semi-definido y una estrategia de alimentación con flujos escalonados, se alcanzó una concentración final de 5.5 g/L de BC-PLC. La misma corresponde a una productividad volumétrica de 0.1 g/L.h, siendo hasta el momento el valor más alto reportado de expresión de una enzima recombinante en esta especie.

El desgomado enzimático en un proceso que presenta una alternativa amigable con el medio ambiente para reemplazar los tradicionales métodos de refinamiento físicos y químicos. En este proceso, las enzimas industriales como las fosfolipasas tienen un rol fundamental eliminando las moléculas de fosfolípidos las cuales generan una merma en el proceso de obtención del aceite. El uso de las mismas brinda un rendimiento extra en el proceso de desgomado dado no sólo por la generación de DAGs al hidrolizar los fosfolípidos, sino también por la liberación de TAGs los cuales normalmente quedan atrapados por los mismos en el proceso de separación por centrifugación. En este sentido, la BC-PLC recombinante obtenida a partir de *C. glutamicum*, demostró una gran eficiencia al momento de hidrolizar PC y PE los cuales representan en conjunto el 70% de los fosfolípidos presentes en el aceite crudo. Por otro lado, el análisis mediante HPLC reflejó una conversión completa de estos fosfolípidos a DAGs, lo cual representa una contribución significativa a la productividad y la economía del proceso de desgomado del aceite crudo. Esta eficiencia notable fue obtenida en condiciones comparables al proceso de refinamiento que se realiza en una planta, posibilitando de esta manera un potencial traslado del desarrollo realizado con esta enzima a niveles industriales.

Como fue mencionado previamente, el uso de PLCs propone una mejora con respecto al desgomado acuoso no sólo por la eliminación de los fosfolípidos, sino también por la generación DAGs recuperados en la fase oleosa. Este fenómeno da como resultado un rendimiento extra en el proceso de obtención de aceite, el cual

generalmente representa el 1% del total obtenido. Considerando que una planta de tratamiento de aceite procesa miles de toneladas diarias, cabe destacar que el uso de la tecnología de producción de la BC-PLC desarrollada en esta tesis tendría un impacto significativo sobre la economía del proceso de desgomado enzimático. Teniendo en cuenta el costo actual del aceite de 600 dólares por tonelada y el rendimiento extra generado en el tratamiento enzimático utilizando las condiciones propuestas en este trabajo (5g de BC-PLC por tonelada de aceite), se podría estimar una ganancia aproximada de 1.2 dólares por gramo de enzima.

Conclusiones

- Se diseñó un vector sintético denominado pTGR en el cual todos sus componentes se encuentran flanqueados por sitios de restricción únicos.
- El pTGR permite el rápido intercambio de secuencias demostrando su capacidad como vector de prueba de elementos regulatorios como promotores y RBSs.
- El pTGR también posibilita la obtención de construcciones que permiten la expresión de varios genes simultáneamente en diversos formatos. El sistema fue validado utilizando genes reporteros para ensayar el ensamblado de operones duales y clústers que contienen dos unidades transcripcionales.
- La variación la concentración del inductor así como el intercambio de orígenes de replicación con distinto número de copias, también pueden ser utilizadas para regular la expresión de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*.
- Aprovechando las ventajas que brinda la plataforma pTGR se estudiaron distintas secuencias de secreción del sistema Tat, demostrando que la correspondiente a la proteína PhoD de *B. subtilis* resultó la más eficiente al momento de secretar el gen reportero mCherry.
- Se sobreexpresaron los genes de la vía Tat (Tat A, B y C), desde el vector pTGR, demostrando que es posible aumentar la eficiencia de secreción aprovechando la versatilidad que brinda esta herramienta genética.
- Utilizando diferentes péptidos señales evaluados con el sistema pTGR se logró expresar y secretar la fosfolipasa C de *B. cereus* en *C. glutamicum*, una enzima de potencial interés industrial.
- El péptido señal salvaje de la BC-PLC, que utiliza la vía general Sec en *B. cereus*, dio como resultado una eficiencia de secreción para esta enzima superior a la obtenida con las secuencias más eficientes reportadas para *C. glutamicum*.

- El agregado de tripsina fue estrictamente necesario para la obtención la BC-PLC madura activa, demostrando que *C. glutamicum* es capaz de secretar pero no procesar el pro- péptido de esta enzima.
- La optimización de la secuencia de la PLC-BC para su expresión en *C. glutamicum*, mediante el software Optimizer, no reflejó un aumento en la cantidad de enzima producida.
- Mediante un proceso de fermentación en Fed-batch se obtuvieron 5.5 g/L de enzima secretada luego de 55 h de proceso correspondiendo a una productividad volumétrica de 0.1 g/L.h, siendo hasta el momento, el valor más alto reportado de expresión de una enzima recombinante en esta especie.
- La enzima recombinante fue capaz de hidrolizar completamente los fosfolípidos mayoritarios del aceite crudo de soja fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, demostrando su capacidad para el proceso de desgomado enzimático.
- Teniendo en cuenta las condiciones propuestas en este trabajo y el rendimiento extra generado durante el tratamiento, se podría estimar una ganancia aproximada de 1.2 dólares por gramo de enzima.

Resumen

El uso de herramientas de biología sintética permite realizar una contribución significativa para el avance de la ingeniería genética, mediante la reducción de los tiempos de desarrollo de organismos recombinantes. Sin embargo, la mayoría de las herramientas de biología sintética han sido obtenidas para *E. coli*. En este proyecto se ha desarrollado una plataforma para modificar genéticamente de manera rápida un microorganismo de alto interés industrial como *C. glutamicum*.

En este trabajo fue diseñado un vector sintético denominado pTGR, en el cual todos sus componentes se encuentran flanqueados por sitios de restricción únicos. El mismo permite el rápido intercambio de secuencias regulatorias así como la obtención de construcciones que permiten la expresión de varios genes simultáneamente. La plataforma que provee el sistema del pTGR contribuye a la exploración de partes involucradas en la expresión génica y facilita el rápido ensamblado de circuitos genéticos el cual permite realizar ingeniería metabólica en *C. glutamicum*. El sistema fue validado utilizando genes reporteros para ensayar promotores y RBSs y para el ensamblado de operones duales y clústers que contienen dos unidades transcripcionales. Por otro lado se estudiaron estrategias alternativas, que no dependen de elementos reguladores de la transcripción. En este sentido, se determinó que tanto la variación la concentración del inductor así como el intercambio de orígenes de replicación con distinto número de copias, también pueden ser utilizados como herramientas para regular los niveles de expresión de proteínas recombinantes en *C. glutamicum*.

Utilizando las ventajas que provee la plataforma pTGR se estudiaron distintas secuencias de secreción del sistema Tat en *C. glutamicum* reportadas en la bibliografía, demostrando que la correspondiente a la proteína PhoD de *B. subtilis* resultó la más eficiente al momento de secretar el gen reportero mCherry. Además, aprovechando la versatilidad que brinda esta herramienta, se sobre-expresaron los traslocadores de la vía Tat, desde el vector pTGR, demostrando que es posible lograr un aumento de la eficiencia de secreción mediante esta estrategia.

A continuación se buscó emplear la herramienta genética creada para su utilización en sistemas de expresión de proteínas de interés industrial. Así, se utilizaron diferentes péptidos señales evaluados con el sistema pTGR para expresar y secretar la fosfolipasa C de *B. cereus* (BC-PLC). Esta enzima es un candidato atractivo para el proceso de desgomado enzimático, de aceites consumibles, debido a su capacidad de degradar fosfolípidos. Durante el refinamiento del aceite los

fosfolípidos capturan los triacilglicéridos disminuyendo el rendimiento del proceso. Entre las distintas secuencias señales ensayadas, la salvaje de la BC-PLC que utiliza la vía general Sec, fue la que demostró la mayor eficiencia de secreción. A partir de la misma se obtuvieron 0.12 g/L de enzima en sobrenadante de cultivos en Batch de *C. glutamicum*.

En la última etapa del trabajo con el fin de obtener un proceso industrial económicamente viable para la manufactura de la BC-PLC, se evaluó un proceso de Fed-batch a partir de la cepa de *C. glutamicum* previamente desarrollada para la producción y secreción de esta enzima. Utilizando un medio semi definido y una estrategia de alimentación con flujos escalonados, se alcanzó una concentración final de 5.5 g/L luego de 55 h de proceso. La misma corresponde a una productividad volumétrica de 0.1 g/L.h, siendo hasta el momento el valor más alto reportado de expresión de una enzima heteróloga en esta especie.

Finalmente a partir de ensayos de RMN, se demostró que la enzima recombinante fue capaz de hidrolizar completamente los fosfolípidos mayoritarios del aceite crudo de soja fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, demostrando su capacidad para el proceso de desgomado enzimático.

Referencias

1. Kinoshita S, Udaka S, Shimono M: **Studies on the amino acid fermentation. Part 1. Production of L-glutamic acid by various microorganisms.** *J Gen Appl Microbiol* 2004, **50**(6):331-343.
2. Yukawa H, Inui M (eds.): **Corynebacterium glutamicum: Biology and Biotechnology.** Munster: Springer; 2013.
3. Burkovski A (ed.): **Corynebacteria Genomics and Molecular Biology.** Norfolk UK: Caister Academic Press; 2008.
4. Udaka S: **Screening method for microorganisms accumulating metabolites and its use in the isolation of Micrococcus glutamicus.** *J Bacteriol* 1960, **79**:754-755.
5. Eggeling L, Bott M (eds.): **Handbook of Corynebacterim glutamicum.** Boca Raton, FL: CRC Press; 2005.
6. Kimura E: **Metabolic engineering of glutamate production.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003, **79**:37-57.
7. Ikeda M, Ozaki A, Katsumata R: **Phenylalanine production by metabolically engineered Corynebacterium glutamicum with the pheA gene of Escherichia coli.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1993, **39**(3):318-323.
8. Peters-Wendisch P, Stolz M, Etterich H, Kennerknecht N, Sahm H, Eggeling L: **Metabolic engineering of Corynebacterium glutamicum for L-serine production.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(11):7139-7144.
9. Ikeda M, Nakagawa S: **The Corynebacterium glutamicum genome: features and impacts on biotechnological processes.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**(2-3):99-109.
10. Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L et al: **The complete Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins.** *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):5-25.
11. Liebl W, Ehrmann M, Ludwig W, Schleifer KH: **Transfer of Brevibacterium divaricatum DSM 20297T, "Brevibacterium flavum" DSM 20411, "Brevibacterium lactofermentum" DSM 20412 and DSM 1412, and Corynebacterium glutamicum and their distinction by rRNA gene restriction patterns.** *Int J Syst Bacteriol* 1991, **41**(2):255-260.
12. Burkovski A: **Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity.** *ISRN Microbiol* 2013, **2013**:935736.
13. Puech V, Chami M, Lemassu A, Laneelle MA, Schiffler B, Gounon P, Bayan N, Benz R, Daffe M: **Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 5):1365-1382.
14. Gebhardt H, Meniche X, Tropis M, Kramer R, Daffe M, Morbach S: **The key role of the mycolic acid content in the functionality of the cell wall permeability barrier in Corynebacterineae.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 5):1424-1434.
15. Kumagai H: **Microbial production of amino acids in Japan.** *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2000, **69**:71-85.
16. Hermann T: **Industrial production of amino acids by coryneform bacteria.** *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):155-172.

17. Kholy ER, Eikmanns BJ, Gutmann M, Sahm H: **Glutamate Dehydrogenase Is Not Essential for Glutamate Formation by *Corynebacterium glutamicum***. *Appl Environ Microbiol* 1993, **59**(7):2329-2331.
18. Kumagai H: **Microbial production of amino acids in Japan**. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2000, **69**:71–85.
19. Ault A: **The monosodium glutamate story: the commercial production of MSG and other amino acids**. *Journal of Chemical Education* 2004, **81**:347–355.
20. Wittmann C, Becker J: **The L-lysine story: from metabolic pathways to industrial production**. In: *Amino acid biosynthesis*. Edited by Wendisch V. Heidelberg: Springer; 2007: 39–70.
21. Pfefferle W, Mockel B, Bathe B, Marx A: **Biotechnological manufacture of lysine**. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2003, **79**:59-112.
22. Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K: **Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **69**(1):1-8.
23. Utagawa T: **Production of arginine by fermentation**. *J Nutr* 2004, **134**(10 Suppl):2854S-2857S; discussion 2895S.
24. Jojima T, Fujii M, Mori E, Inui M, Yukawa H: **Engineering of sugar metabolism of *Corynebacterium glutamicum* for production of amino acid L-alanine under oxygen deprivation**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**(1):159-165.
25. John RP, G SA, Nampoothiri KM, Pandey A: **Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production**. *Biotechnol Adv* 2009, **27**(2):145-152.
26. Okino S, Inui M, Yukawa H: **Production of organic acids by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **68**(4):475-480.
27. Inui M, Murakami S, Okino S, Kawaguchi H, Vertes AA, Yukawa H: **Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions**. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **7**(4):182-196.
28. Xu J, Guo BH: **Poly(butylene succinate) and its copolymers: research, development and industrialization**. *Biotechnol J* 2010, **5**(11):1149-1163.
29. Kurzrock T, Weuster-Botz D: **Recovery of succinic acid from fermentation broth**. *Biotechnol Lett* 2010, **32**(3):331-339.
30. Bechthold I, Bretz K, Kabasci S, Kopitzky R, Springer A: **Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources**. *Chemical Engineering & Technology* 2008, **31**(5):647-654.
31. Beauprez JJ, Mey MD, Soetaert WK: **Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers**. *Process Biochemistry* 2010, **45**(7):1103–1114.
32. Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H: **An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **81**(3):459-464.
33. Nikolau BJ, Perera MA, Brachova L, Shanks B: **Platform biochemicals for a biorenewable chemical industry**. *Plant J* 2008, **54**(4):536-545.

34. Weusthuis RA, Lamot I, van der Oost J, Sanders JP: **Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes.** *Trends Biotechnol* 2011, **29**(4):153-158.
35. Inui M, Kawaguchi H, Murakami S, Vertes AA, Yukawa H: **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for fuel ethanol production under oxygen-deprivation conditions.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2004, **8**(4):243-254.
36. Sasaki M, Jojima T, Inui M, Yukawa H: **Simultaneous utilization of D-cellobiose, D-glucose, and D-xylose by recombinant *Corynebacterium glutamicum* under oxygen-deprived conditions.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **81**(4):691-699.
37. Durre P: **Biobutanol: an attractive biofuel.** *Biotechnol J* 2007, **2**(12):1525-1534.
38. Gogerty DS, Bobik TA: **Formation of isobutene from 3-hydroxy-3-methylbutyrate by diphosphomevalonate decarboxylase.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**(24):8004-8010.
39. Blombach B, Riester T, Wieschalka S, Ziert C, Youn JW, Wendisch VF, Eikmanns BJ: ***Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**(10):3300-3310.
40. Becker J, Wittmann C: **Bio-based production of chemicals, materials and fuels -*Corynebacterium glutamicum* as versatile cell factory.** *Curr Opin Biotechnol* 2012, **23**(4):631-640.
41. Demain AL, Vaishnav P: **Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms.** *Biotechnol Adv* 2009, **27**(3):297-306.
42. Baneyx F: **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*.** *Curr Opin Biotechnol* 1999, **10**(5):411-421.
43. Swartz JR: **Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins.** *Curr Opin Biotechnol* 2001, **12**(2):195-201.
44. Andersen DC, Krummen L: **Recombinant protein expression for therapeutic applications.** *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**(2):117-123.
45. Lee SY: **High cell-density culture of *Escherichia coli*.** *Trends Biotechnol* 1996, **14**(3):98-105.
46. Chen R: **Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond.** *Biotechnol Adv* 2012, **30**(5):1102-1107.
47. Petsch D, Anspach FB: **Endotoxin removal from protein solutions.** *J Biotechnol* 2000, **76**(2-3):97-119.
48. Fischer B, Sumner I, Goodenough P: **Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies.** *Biotechnol Bioeng* 1993, **41**(1):3-13.
49. Hockney RC: **Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*.** *Trends Biotechnol* 1994, **12**(11):456-463.
50. Lam KH, Chow KC, Wong WK: **Construction of an efficient *Bacillus subtilis* system for extracellular production of heterologous proteins.** *J Biotechnol* 1998, **63**(3):167-177.
51. Olmos-Soto J, Contreras-Flores R: **Genetic system constructed to overproduce and secrete proinsulin in *Bacillus subtilis*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, **62**(4):369-373.
52. Palva I, Lehtovaara P, Kaariainen L, Sibakov M, Cantell K, Schein CH, Kashiwagi K, Weissmann C: **Secretion of interferon by *Bacillus subtilis*.** *Gene* 1983, **22**(2-3):229-235.

53. Kakeshita H, Kageyama Y, Endo K, Tohata M, Ara K, Ozaki K, Nakamura K: **Secretion of biologically-active human interferon-beta by *Bacillus subtilis***. *Biotechnol Lett* 2011, **33**(9):1847-1852.
54. Freudl R: **Protein secretion in gram-positive bacteria**. *J Biotechnol* 1992, **23**(3):231-240.
55. Harwood CR: ***Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses**. *Trends Biotechnol* 1992, **10**(7):247-256.
56. Kawamura F, Doi RH: **Construction of a *Bacillus subtilis* double mutant deficient in extracellular alkaline and neutral proteases**. *J Bacteriol* 1984, **160**(1):442-444.
57. Stahl ML, Ferrari E: **Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an In vitro-derived deletion mutation**. *J Bacteriol* 1984, **158**(2):411-418.
58. El-Helow ER, Abdel-Fattah YR, Ghanem KM, Mohamad EA: **Application of the response surface methodology for optimizing the activity of an aprE-driven gene expression system in *Bacillus subtilis***. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **54**(4):515-520.
59. Oh MK, Kim BG, Park SH: **Importance of spore mutants for fed-batch and continuous fermentation of *Bacillus subtilis***. *Biotechnol Bioeng* 1995, **47**(6):696-702.
60. Westers L, Westers H, Quax WJ: ***Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism**. *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):299-310.
61. Jenkins N, Curling EM: **Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects**. *Enzyme Microb Technol* 1994, **16**(5):354-364.
62. Brooks SA: **Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system**. *Mol Biotechnol* 2004, **28**(3):241-255.
63. Cereghino JL, Cregg JM: **Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris***. *FEMS Microbiol Rev* 2000, **24**(1):45-66.
64. Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM: **Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris***. *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**(4):329-332.
65. Chiba Y, Suzuki M, Yoshida S, Yoshida A, Ikenaga H, Takeuchi M, Jigami Y, Ichishima E: **Production of human compatible high mannose-type (Man5GlcNAc2) sugar chains in *Saccharomyces cerevisiae***. *J Biol Chem* 1998, **273**(41):26298-26304.
66. Zhao W, Wang J, Deng R, Wang X: **Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter**. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2008, **35**(3):189-195.
67. Varnai A, Tang C, Bengtsson O, Atterton A, Mathiesen G, Eijlsink VG: **Expression of endoglucanases in *Pichia pastoris* under control of the GAP promoter**. *Microb Cell Fact* 2014, **13**(1):57.
68. Mao R, Teng D, Wang X, Zhang Y, Jiao J, Cao X, Wang J: **Optimization of expression conditions for a novel NZ2114-derived antimicrobial peptide-MP1102 under the control of the GAP promoter in *Pichia pastoris* X-33**. *BMC Microbiol* 2015, **15**:57.
69. Bretthauer RK, Castellino FJ: **Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins**. *Biotechnol Appl Biochem* 1999, **30** (Pt 3):193-200.

70. Gerngross TU: **Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**(11):1409-1414.
71. Gellissen G: **Heterologous protein production in methylotrophic yeasts.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2000, **54**(6):741-750.
72. Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW: **On the safety of *Aspergillus niger*--a review.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2002, **59**(4-5):426-435.
73. Dunn-Coleman NS, Bloebaum P, Berka RM, Bodie E, Robinson N, Armstrong G, Ward M, Przetak M, Carter GL, LaCost R *et al*: **Commercial levels of chymosin production by *Aspergillus*.** *Biotechnology (N Y)* 1991, **9**(10):976-981.
74. Lamsa M, Bloebaum P: **Mutation and screening to increase chymosin yield in a genetically engineered strain of *Aspergillus awamori*.** *J Ind Microbiol* 1990, **5**:229-238.
75. Pel HJ, de Winde JH, Archer DB, Dyer PS, Hofmann G, Schaap PJ, Turner G, de Vries RP, Albang R, Albermann K *et al*: **Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88.** *Nat Biotechnol* 2007, **25**(2):221-231.
76. Salovuori I, Makarow M, Rauvala H, Knowles J, Kääriäinen L: **Low Molecular Weight High-Mannose Type Glycans in a Secreted Protein of the Filamentous Fungus *Trichoderma Reesei*.** *Nature Biotechnology* 1987, **5**:152 - 156
77. Ward M, Lin C, Victoria DC, Fox BP, Fox JA, Wong DL, Meerman HJ, Pucci JP, Fong RB, Heng MH *et al*: **Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**(5):2567-2576.
78. Ward PP, Piddington CS, Cunningham GA, Zhou X, Wyatt RD, Conneely OM: **A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic.** *Biotechnology (N Y)* 1995, **13**(5):498-503.
79. Fleissner A, Dersch P: **Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**(4):1255-1270.
80. Tako M, Kotogan A, Krisch J, Vagvolgyi C, Mondal KC, Papp T: **Enhanced production of industrial enzymes in Mucoromycotina fungi during solid-state fermentation of agricultural wastes/by-products.** *Acta Biol Hung* 2015, **66**(3):348-360.
81. Buddhiwant P, Bhavsar K, Kumar VR, Khire JM: **Phytase Production by Solid State Fermentation of Groundnut Oil Cake by *Aspergillus niger*: A Bioprocess Optimization Study for Animal Feedstock Applications.** *Prep Biochem Biotechnol* 2015.
82. Maras M, De Bruyn A, Vervecken W, Uusitalo J, Penttilä M, Busson R, Herdewijn P, Contreras R: **In vivo synthesis of complex N-glycans by expression of human N-acetylglucosaminyltransferase I in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** *FEBS Lett* 1999, **452**(3):365-370.
83. Maras M, Saelens X, Laroy W, Piens K, Claeysens M, Fiers W, Contreras R: **In vitro conversion of the carbohydrate moiety of fungal glycoproteins to mammalian-type oligosaccharides--evidence for N-acetylglucosaminyltransferase-I-accepting glycans from *Trichoderma reesei*.** *Eur J Biochem* 1997, **249**(3):701-707.

84. Punt PJ, van Biezen N, Conesa A, Albers A, Mangnus J, van den Hondel C: **Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production.** *Trends Biotechnol* 2002, **20**(5):200-206.
85. Wurm FM: **Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**(11):1393-1398.
86. Huang YM, Hu W, Rustandi E, Chang K, Yusuf-Makagiansar H, Ryll T: **Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment.** *Biotechnol Prog* 2010, **26**(5):1400-1410.
87. Ramirez OT, Sureshkumar GK, Mutharasan R: **Bovine colostrum or milk as a serum substitute for the cultivation of a mouse hybridoma.** *Biotechnol Bioeng* 1990, **35**(9):882-889.
88. Ramirez OT, Mutharasan R: **The role of the plasma membrane fluidity on the shear sensitivity of hybridomas grown under hydrodynamic stress.** *Biotechnol Bioeng* 1990, **36**(9):911-920.
89. Marks DM: **Equipment design considerations for large scale cell culture.** *Cytotechnology* 2003, **42**(1):21-33.
90. Xing Z, Kenty BM, Li ZJ, Lee SS: **Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors.** *Biotechnol Bioeng* 2009, **103**(4):733-746.
91. Colosimo A, Goncz KK, Holmes AR, Kunzelmann K, Novelli G, Malone RW, Bennett MJ, Gruenert DC: **Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells.** *Biotechniques* 2000, **29**(2):314-318, 320-312, 324 passim.
92. Kramer O, Klausning S, Noll T: **Methods in mammalian cell line engineering: from random mutagenesis to sequence-specific approaches.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **88**(2):425-436.
93. Zheng H, Wilson JH: **Gene targeting in normal and amplified cell lines.** *Nature* 1990, **344**(6262):170-173.
94. Wilson TJ, Kola I: **The LoxP/CRE system and genome modification.** *Methods Mol Biol* 2001, **158**:83-94.
95. Ronda C, Pedersen LE, Hansen HG, Kallehauge TB, Betenbaugh MJ, Nielsen AT, Kildegaard HF: **Accelerating genome editing in CHO cells using CRISPR Cas9 and CRISPy, a web-based target finding tool.** *Biotechnol Bioeng* 2014, **111**(8):1604-1616.
96. Doudna JA, Charpentier E: **Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9.** *Science* 2014, **346**(6213):1258096.
97. Singh N, Arunkumar A, Chollangi S, Tan ZG, Borys M, Li ZJ: **Clarification technologies for monoclonal antibody manufacturing processes: Current state and future perspectives.** *Biotechnol Bioeng* 2015.
98. Lai T, Yang Y, Ng SK: **Advances in Mammalian cell line development technologies for recombinant protein production.** *Pharmaceuticals (Basel)* 2013, **6**(5):579-603.
99. Vertes AA, Inui M, Yukawa H: **Technological options for biological fuel ethanol.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008, **15**(1):16-30.
100. Vertes AA, Inui M, Kobayashi M, Kurusu Y, Yukawa H: **Presence of mrr- and mcr-like restriction systems in coryneform bacteria.** *Res Microbiol* 1993, **144**(3):181-185.
101. Nakamura Y, Nishio Y, Ikeo K, Gojobori T: **The genome stability in *Corynebacterium* species due to lack of the recombinational repair system.** *Gene* 2003, **317**(1-2):149-155.

102. Nesvera J, Patek M: **Plasmids and promoters in corynebacteria and their applications**. In: *Corynebacteria: genomics and molecular biology*. Edited by Burkovski A. Norfolk: Caister Academic; 2008: 113–154.
103. Tsuchida Y, Kimura S, Suzuki N, Inui M, Yukawa H: **Characterization of a 24-kb plasmid pCGR2 newly isolated from *Corynebacterium glutamicum***. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **87**(5):1855-1866.
104. Kirchner O, Tauch A: **Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum***. *J Biotechnol* 2003, **104**(1-3):287-299.
105. Nesvera J, Patek M: **Tools for genetic manipulations in *Corynebacterium glutamicum* and their applications**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **90**(5):1641-1654.
106. Kawaguchi H, Vertes AA, Okino S, Inui M, Yukawa H: **Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum***. *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(5):3418-3428.
107. Vertes A, Inui M, Yukawa H: **Alternative technologies for biotechnological fuel ethanol manufacturing**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 2007, **82**:693–697.
108. Yim SS, An SJ, Choi JW, Ryu AJ, Jeong KJ: **High-level secretory production of recombinant single-chain variable fragment (scFv) in *Corynebacterium glutamicum***. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**(1):273-284.
109. Inui M, Vertes A, Yukawa H: **Advanced fermentation technologies**. In: *Biomass to biofuels: strategies for global industries*. Edited by Vertes A, Qureshi N, Blaschek H, Yukawa H. Chichester, UK: Wiley; 2010: 311–330.
110. Date M, Itaya H, Matsui H, Kikuchi Y: **Secretion of human epidermal growth factor by *Corynebacterium glutamicum***. *Lett Appl Microbiol* 2006, **42**(1):66-70.
111. Kikuchi Y, Date M, Itaya H, Matsui K, Wu LF: **Functional analysis of the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13869**. *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**(11):7183-7192.
112. Yukawa H, Inui M (eds.): **Genomes and genome-level engineering of amino acid producing bacteria**. Berlin: Springer; 2007.
113. Heider SA, Peters-Wendisch P, Netzer R, Stafnes M, Brautaset T, Wendisch VF: **Production and glucosylation of C50 and C 40 carotenoids by metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum***. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**(3):1223-1235.
114. Paradis FW, Warren RA, Kilburn DG, Miller RC, Jr.: **The expression of *Cellulomonas fimi* cellulase genes in *Brevibacterium lactofermentum***. *Gene* 1987, **61**(2):199-206.
115. Itaya H, Kikuchi Y: **Secretion of *Streptomyces mobaraensis* pro-transglutaminase by coryneform bacteria**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **78**(4):621-625.
116. Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y: **High level expression of *Streptomyces mobaraensis* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum* using a chimeric pro-region from *Streptomyces cinnamoneus* transglutaminase**. *J Biotechnol* 2004, **110**(3):219-226.
117. Umezawa Y, Yokoyama K, Kikuchi Y, Date M, Onishi N: **Method of producing microbial transglutaminase** In., vol. US 8105802 B2; 2012.

118. Watanabe K, Teramoto H, Suzuki N, Inui M, Yukawa H: **Influence of SigB inactivation on *Corynebacterium glutamicum* protein secretion.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**(11):4917-4926.
119. Yim SS, Choi JW, Lee RJ, Lee YJ, Lee SH, Kim SY, Jeong KJ: **Development of a new platform for secretory production of recombinant proteins in *Corynebacterium glutamicum*.** *Biotechnol Bioeng* 2015.
120. Kikuchi Y, Itaya H, Date M, Matsui K, Wu LF: **TatABC overexpression improves *Corynebacterium glutamicum* Tat-dependent protein secretion.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(3):603-607.
121. Kikuchi Y, Itaya H, Date M, Matsui K, Wu LF: **Production of *Chryseobacterium proteolyticum* protein-glutaminase using the twin-arginine translocation pathway in *Corynebacterium glutamicum*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2008, **78**(1):67-74.
122. Adham SA, Honrubia P, Diaz M, Fernandez-Abalos JM, Santamaria RI, Gil JA: **Expression of the genes coding for the xylanase Xys1 and the cellulase Cel1 from the straw-decomposing *Streptomyces halstedii* JM8 cloned into the amino-acid producer *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869.** *Arch Microbiol* 2001, **177**(1):91-97.
123. Billman-Jacobe H, Wang L, Kortt A, Stewart D, Radford A: **Expression and secretion of heterologous proteases by *Corynebacterium glutamicum*.** *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**(4):1610-1613.
124. Liebl W, Sinskey AJ, Schleifer KH: **Expression, secretion, and processing of staphylococcal nuclease by *Corynebacterium glutamicum*.** *J Bacteriol* 1992, **174**(6):1854-1861.
125. Tateno T, Fukuda H, Kondo A: **Direct production of L-lysine from raw corn starch by *Corynebacterium glutamicum* secreting *Streptococcus bovis* alpha-amylase using cspB promoter and signal sequence.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **77**(3):533-541.
126. Meissner D, Vollstedt A, van Dijl JM, Freudl R: **Comparative analysis of twin-arginine (Tat)-dependent protein secretion of a heterologous model protein (GFP) in three different Gram-positive bacteria.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **76**(3):633-642.
127. Salim K, Haedens V, Content J, Leblon G, Huygen K: **Heterologous expression of the *Mycobacterium tuberculosis* gene encoding antigen 85A in *Corynebacterium glutamicum*.** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**(11):4392-4400.
128. Diaz M, Adham SA, Ramon D, Gil JA, Santamaria RI: ***Streptomyces lividans* and *Brevibacterium lactofermentum* as heterologous hosts for the production of X22 xylanase from *Aspergillus nidulans*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2004, **65**(4):401-406.
129. Adham SA, Campelo AB, Ramos A, Gil JA: **Construction of a xylanase-producing strain of *Brevibacterium lactofermentum* by stable integration of an engineered xysA gene from *Streptomyces halstedii* JM8.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**(12):5425-5430.
130. Cadenas RF, Gil JA, Martin JF: **Expression of *Streptomyces* genes encoding extracellular enzymes in *Brevibacterium lactofermentum*: secretion proceeds by removal of the same leader peptide as in *Streptomyces lividans*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1992, **38**(3):362-369.

131. Watanabe K, Tsuchida Y, Okibe N, Teramoto H, Suzuki N, Inui M, Yukawa H: **Scanning the *Corynebacterium glutamicum* R genome for high-efficiency secretion signal sequences.** *Microbiology* 2009, **155**(Pt 3):741-750.
132. Andrianantoandro E, Basu S, Karig DK, Weiss R: **Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline.** *Mol Syst Biol* 2006, **2**:2006 0028.
133. Tian J, Gong H, Sheng N, Zhou X, Gulari E, Gao X, Church G: **Accurate multiplex gene synthesis from programmable DNA microchips.** *Nature* 2004, **432**(7020):1050-1054.
134. Sleight SC, Bartley BA, Lieviant JA, Sauro HM: **In-Fusion BioBrick assembly and re-engineering.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(8):2624-2636.
135. Lynch SA, Gill RT: **Synthetic biology: new strategies for directing design.** *Metab Eng* 2012, **14**(3):205-211.
136. Dormitzer PR, Suphaphiphat P, Gibson DG, Wentworth DE, Stockwell TB, Algire MA, Alperovich N, Barro M, Brown DM, Craig S *et al*: **Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics.** *Sci Transl Med* 2013, **5**(185):185ra168.
137. Elena C, Ravasi P, Castelli ME, Peiru S, Menzella HG: **Expression of codon optimized genes in microbial systems: current industrial applications and perspectives.** *Front Microbiol* 2014, **5**:21.
138. Nakayama K, Araki K, Kase H: **Microbial production of essential amino acid with *Corynebacterium glutamicum* mutants.** *Adv Exp Med Biol* 1978, **105**:649-661.
139. Woo HM, Park JB: **Recent progress in development of synthetic biology platforms and metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum*.** *J Biotechnol* 2014, **180**:43-51.
140. Rytter JV, Helmark S, Chen J, Lezyk MJ, Solem C, Jensen PR: **Synthetic promoter libraries for *Corynebacterium glutamicum*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**(6):2617-2623.
141. Yim SS, An SJ, Kang M, Lee J, Jeong KJ: **Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*.** *Biotechnol Bioeng* 2013, **110**(11):2959-2969.
142. Indira TN, Hemavathy J, Khatoon S, Gopala Krishna AG, Battacharya S: **Water degumming of rice bran oil: A response surface approach.** *J Food Eng* 2000, **43**:83-90.
143. Dijkstra AJ, Van Opstal M: **The total degumming process.** *J Am Oil Chem Soc* 1989, **66**:1002-1009.
144. Klaus D: **An enzymatic process for the physical refining os seed oils.** *Chem Eng Technol* 1998, **21**:3-6.
145. Yang JG, Wang YH, Yang B, Mainda G, Guo Y: **Degumming of vegetable oil by a new microbial lipase.** *Food TechnolBiotechnol* 2006., **44**:101-104.
146. Aalrust E, Beyer W, Ottofrickenstein H, Penk G, Plainer H, Rainer R: **Enzymatic method for reducing the amount of phosphorus-containing components in vegetable and animal oils.** In: *European* vol. 0513709; 1992.
147. Clausen K: **An Enzymatic oil-degumming process.** In., vol. WO1999/053001; 2001.
148. Tsutsumi N, Vind J, Patkar S: **Method of generating diversity into lipolytic enzymes and lipolytic enzyme genes. patent WO/2002/066622.** In., vol. WO2002/066622; 2002.

149. Gramatikova SG, Hazelwood G, Lam D: **Phospholipase, nucleic acids encoding them and methods for making and using them.** In., vol. WO2005/086900; 2005.
150. Dayton CLG, Galhardo F: **Enzymatic degumming utilizing a mixture of PLA and PLC phospholipases.** In.; 2008.
151. Bai C, Zhao L, Tsai MD, Bruzik KS: **Unique catalytic mechanism of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Streptomyces antibioticus*.** *J Am Chem Soc* 2010, **132**(4):1210-1211.
152. Nygren B: **Phospholipase C-producing bacteria and food poisoning. An experimental study on *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus*.** *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl* 1962, **Suppl 160**:1-88.
153. Ottolenghi AC: **Phospholipase C from *Bacillus cereus*, a zinc-requiring metalloenzyme.** *Biochim Biophys Acta* 1965, **106**(3):510-518.
154. Dijkstra AJ: **Enzymatic degumming.** *European Journal of Lipid Science and Technology* 2010, **112**:1178-1189.
155. Yang B, Zhou R, Yang JG, Wang YH, Wang WF: **Insight into the enzymatic degumming process of soybean oil.** *Journal of the American Oil Chemists' Society* 2008, **85**:421-425.
156. Dijkstra AJ, Van Opstal M: **The total degumming process.** *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1989, **66**:1002-1009.
157. Seo KH, Rhee JI: **High-level expression of recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Pichia pastoris* and its characterization.** *Biotechnol Lett* 2004, **26**(19):1475-1479.
158. Durban MA, Silbersack J, Schweder T, Schauer F, Bornscheuer UT: **High level expression of a recombinant phospholipase C from *Bacillus cereus* in *Bacillus subtilis*.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, **74**(3):634-639.
159. Tan CA, Hehir MJ, Roberts MF: **Cloning, overexpression, refolding, and purification of the nonspecific phospholipase C from *Bacillus cereus*.** *Protein Expr Purif* 1997, **10**(3):365-372.
160. Kinoshita S: **The production of amino acids by fermentation processes.** *Adv Appl Microbiol* 1959, **1**:201-214.
161. Hanahan D: **Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.** *J Mol Biol* 1983, **166**(4):557-580.
162. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (eds.): **Molecular cloning. A laboratory manual.** NYC: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1982.
163. Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY: **A guide to choosing fluorescent proteins.** *Nat Methods* 2005, **2**(12):905-909.
164. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC: **Measurement of protein using bicinchoninic acid.** *Anal Biochem* 1985, **150**(1):76-85.
165. Keasling JD: **Manufacturing molecules through metabolic engineering.** *Science* 2010, **330**(6009):1355-1358.
166. Srivastava P, Deb JK: **Gene expression systems in corynebacteria.** *Protein Expr Purif* 2005, **40**(2):221-229.
167. Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J: **Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1.** *Curr Microbiol* 2002, **45**(5):362-367.
168. Tomizawa J: **Control of ColE1 plasmid replication: the process of binding of RNA I to the primer transcript.** *Cell* 1984, **38**(3):861-870.

169. Orosz A, Boros I, Venetianer P: **Analysis of the complex transcription termination region of the *Escherichia coli* *rrnB* gene.** *Eur J Biochem* 1991, **201**(3):653-659.
170. Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H: **Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5.** *Gene* 1982, **19**(3):327-336.
171. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S: **FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).** *Gene* 1996, **173**(1 Spec No):33-38.
172. de Boer HA, Comstock LJ, Vasser M: **The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983, **80**(1):21-25.
173. Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H, Kikuchi Y: **Production of native-type *Streptoverticillium mobaraense* transglutaminase in *Corynebacterium glutamicum*.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(5):3011-3014.
174. Brabetz W, Liebl W, Schleifer KH: **Studies on the utilization of lactose by *Corynebacterium glutamicum*, bearing the lactose operon of *Escherichia coli*.** *Arch Microbiol* 1991, **155**(6):607-612.
175. Becker J, Zelder O, Hafner S, Schroder H, Wittmann C: **From zero to hero--design-based systems metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-lysine production.** *Metab Eng* 2011, **13**(2):159-168.
176. Calos MP: **DNA sequence for a low-level promoter of the lac repressor gene and an 'up' promoter mutation.** *Nature* 1978, **274**(5673):762-765.
177. Patek M, Nesvera J: **Sigma factors and promoters in *Corynebacterium glutamicum*.** *J Biotechnol* 2011, **154**(2-3):101-113.
178. Chen H, Bjerknes M, Kumar R, Jay E: **Determination of the optimal aligned spacing between the Shine-Dalgarno sequence and the translation initiation codon of *Escherichia coli* mRNAs.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**(23):4953-4957.
179. Shepard HM, Yelverton E, Goeddel DV: **Increased synthesis in *E. coli* of fibroblast and leukocyte interferons through alterations in ribosome binding sites.** *DNA* 1982, **1**(2):125-131.
180. Berwal SK, Sreejith RK, Pal JK: **Distance between RBS and AUG plays an important role in overexpression of recombinant proteins.** *Anal Biochem* 2010, **405**(2):275-277.
181. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY: **Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.** *Nat Biotechnol* 2004, **22**(12):1567-1572.
182. Tauch A, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J, Thierbach G: **The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from *Corynebacterium glutamicum* encodes the aminoglycoside adenylyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100.** *Plasmid* 2002, **48**(2):117-129.
183. Tauch A, Bischoff N, Brune I, Kalinowski J: **Insights into the genetic organization of the *Corynebacterium diphtheriae* erythromycin resistance plasmid pNG2 deduced from its complete nucleotide sequence.** *Plasmid* 2003, **49**(1):63-74.
184. Serwold-Davis TM, Groman N, Rabin M: **Transformation of *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*,**

- Corynebacterium glutamicum*, and *Escherichia coli* with the *C. diphtheriae* plasmid pNG2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(14):4964-4968.**
185. Papagianni M: **Recent advances in engineering the central carbon metabolism of industrially important bacteria.** *Microb Cell Fact* 2012, **11**:50.
 186. Lee ME, Aswani A, Han AS, Tomlin CJ, Dueber JE: **Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay.** *Nucleic Acids Res* 2013, **41**(22):10668-10678.
 187. Du J, Yuan Y, Si T, Lian J, Zhao H: **Customized optimization of metabolic pathways by combinatorial transcriptional engineering.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(18):e142.
 188. Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H: **A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene expression, and promoter probing.** *Gene* 1991, **102**(1):93-98.
 189. Brune I, Werner H, Huser AT, Kalinowski J, Puhler A, Tauch A: **The DtxR protein acting as dual transcriptional regulator directs a global regulatory network involved in iron metabolism of *Corynebacterium glutamicum*.** *BMC Genomics* 2006, **7**:21.
 190. Knoppova M, Phensaijai M, Vesely M, Zemanova M, Nesvera J, Patek M: **Plasmid vectors for testing in vivo promoter activities in *Corynebacterium glutamicum* and *Rhodococcus erythropolis*.** *Curr Microbiol* 2007, **55**(3):234-239.
 191. Pfleger BF, Pitera DJ, Smolke CD, Keasling JD: **Combinatorial engineering of intergenic regions in operons tunes expression of multiple genes.** *Nat Biotechnol* 2006, **24**(8):1027-1032.
 192. Basu S, Gerchman Y, Collins CH, Arnold FH, Weiss R: **A synthetic multicellular system for programmed pattern formation.** *Nature* 2005, **434**(7037):1130-1134.
 193. Salis HM, Mirsky EA, Voigt CA: **Automated design of synthetic ribosome binding sites to control protein expression.** *Nat Biotechnol* 2009, **27**(10):946-950.
 194. Agnew DE, Pfleger BF: **Optimization of synthetic operons using libraries of post-transcriptional regulatory elements.** *Methods Mol Biol* 2011, **765**:99-111.
 195. Porcar M: **Beyond directed evolution: Darwinian selection as a tool for synthetic biology.** *Syst Synth Biol* 2010, **4**(1):1-6.
 196. Anand R, Rai N, Thattai M: **Promoter reliability in modular transcriptional networks.** *Methods Enzymol* 2011, **497**:31-49.
 197. Keung AJ, Bashor CJ, Kiriakov S, Collins JJ, Khalil AS: **Using targeted chromatin regulators to engineer combinatorial and spatial transcriptional regulation.** *Cell* 2014, **158**(1):110-120.
 198. Yaung SJ, Deng L, Li N, Braff JL, Church GM, Bry L, Wang HH, Gerber GK: **Improving microbial fitness in the mammalian gut by in vivo temporal functional metagenomics.** *Mol Syst Biol* 2015, **11**(3):788.
 199. Lee TS, Krupa RA, Zhang F, Hajimorad M, Holtz WJ, Prasad N, Lee SK, Keasling JD: **BglBrick vectors and datasheets: A synthetic biology platform for gene expression.** *J Biol Eng* 2011, **5**:12.
 200. Kang MK, Lee J, Um Y, Lee TS, Bott M, Park SJ, Woo HM: **Synthetic biology platform of CoryneBrick vectors for gene expression in *Corynebacterium***

- glutamicum** and its application to xylose utilization. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**(13):5991-6002.
201. Van Dien S: **From the first drop to the first truckload: commercialization of microbial processes for renewable chemicals.** *Curr Opin Biotechnol* 2013, **24**(6):1061-1068.
 202. Royle K, Kontoravdi C: **A systems biology approach to optimising hosts for industrial protein production.** *Biotechnol Lett* 2013, **35**(12):1961-1969.
 203. Foo JL, Ching CB, Chang MW, Leong SS: **The imminent role of protein engineering in synthetic biology.** *Biotechnol Adv* 2012, **30**(3):541-549.
 204. Natale P, Bruser T, Driessen AJ: **Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1778**(9):1735-1756.
 205. Robinson C, Bolhuis A: **Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):135-147.
 206. de Keyser J, van der Does C, Driessen AJ: **The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex.** *Cell Mol Life Sci* 2003, **60**(10):2034-2052.
 207. Wickner W, Driessen AJ, Hartl FU: **The enzymology of protein translocation across the Escherichia coli plasma membrane.** *Annu Rev Biochem* 1991, **60**:101-124.
 208. Stathopoulos C, Hendrixson DR, Thanassi DG, Hultgren SJ, St Geme JW, 3rd, Curtiss R, 3rd: **Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story.** *Microbes Infect* 2000, **2**(9):1061-1072.
 209. Driessen AJ: **SecB, a molecular chaperone with two faces.** *Trends Microbiol* 2001, **9**(5):193-196.
 210. Luirink J, von Heijne G, Houben E, de Gier JW: **Biogenesis of inner membrane proteins in Escherichia coli.** *Annu Rev Microbiol* 2005, **59**:329-355.
 211. Paetzel M, Karla A, Strynadka NC, Dalbey RE: **Signal peptidases.** *Chem Rev* 2002, **102**(12):4549-4580.
 212. Peterson JH, Woolhead CA, Bernstein HD: **Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle.** *J Biol Chem* 2003, **278**(46):46155-46162.
 213. Cunningham K, Wickner W: **Specific recognition of the leader region of precursor proteins is required for the activation of translocation ATPase of Escherichia coli.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989, **86**(22):8630-8634.
 214. Muller M, Klosgen RB: **The Tat pathway in bacteria and chloroplasts (review).** *Mol Membr Biol* 2005, **22**(1-2):113-121.
 215. Alami M, Luke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, Brunner J, Muller M: **Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in Escherichia coli.** *Mol Cell* 2003, **12**(4):937-946.
 216. Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, Palmer T, Saibil HR, Berks BC: **The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(30):10482-10486.
 217. Sargent F, Bogsch EG, Stanley NR, Wexler M, Robinson C, Berks BC, Palmer T: **Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway.** *EMBO J* 1998, **17**(13):3640-3650.

218. Rose RW, Bruser T, Kissinger JC, Pohlschroder M: **Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway.** *Mol Microbiol* 2002, **45**(4):943-950.
219. Weiner JH, Bilous PT, Shaw GM, Lubitz SP, Frost L, Thomas GH, Cole JA, Turner RJ: **A novel and ubiquitous system for membrane targeting and secretion of cofactor-containing proteins.** *Cell* 1998, **93**(1):93-101.
220. Palmer T, Berks BC: **The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway.** *Nat Rev Microbiol* 2012, **10**(7):483-496.
221. Berks BC: **A common export pathway for proteins binding complex redox cofactors?** *Mol Microbiol* 1996, **22**(3):393-404.
222. Stanley NR, Palmer T, Berks BC: **The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 2000, **275**(16):11591-11596.
223. Dalbey RE: **Positively charged residues are important determinants of membrane protein topology.** *Trends Biochem Sci* 1990, **15**(7):253-257.
224. Heijne G: **The distribution of positively charged residues in bacterial inner membrane proteins correlates with the trans-membrane topology.** *EMBO J* 1986, **5**(11):3021-3027.
225. Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G: **Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites.** *Protein Eng* 1997, **10**(1):1-6.
226. van Roosmalen ML, Geukens N, Jongbloed JD, Tjalsma H, Dubois JY, Bron S, van Dijk JM, Anne J: **Type I signal peptidases of Gram-positive bacteria.** *Biochim Biophys Acta* 2004, **1694**(1-3):279-297.
227. Teramoto H, Watanabe K, Suzuki N, Inui M, Yukawa H: **High yield secretion of heterologous proteins in *Corynebacterium glutamicum* using its own Tat-type signal sequence.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2011, **91**(3):677-687.
228. Johansen T, Holm T, Guddal PH, Sletten K, Haugli FB, Little C: **Cloning and sequencing of the gene encoding the phosphatidylcholine-preferring phospholipase C of *Bacillus cereus*.** *Gene* 1988, **65**(2):293-304.
229. Lazarowski ER, Lapetina EG: **Persistent activation of platelet membrane phospholipase C by proteolytic action of trypsin and thrombin.** *Arch Biochem Biophys* 1990, **276**(1):265-269.
230. Hough E, Hansen LK, Birknes B, Jynge K, Hansen S, Hordvik A, Little C, Dodson E, Derewenda Z: **High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*.** *Nature* 1989, **338**(6213):357-360.
231. Grosjean H, Fiers W: **Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes.** *Gene* 1982, **18**(3):199-209.
232. Kuhn AN, Beibetaert T, Simon P, Vallazza B, Buck J, Davies BP, Tureci O, Sahin U: **mRNA as a versatile tool for exogenous protein expression.** *Curr Gene Ther* 2012, **12**(5):347-361.
233. Hess AK, Saffert P, Liebeton K, Ignatova Z: **Optimization of translation profiles enhances protein expression and solubility.** *PLoS One* 2015, **10**(5):e0127039.
234. Carbone A, Zinovyev A, Kepes F: **Codon adaptation index as a measure of dominating codon bias.** *Bioinformatics* 2003, **19**(16):2005-2015.
235. Sharp PM, Li WH: **The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications.** *Nucleic Acids Res* 1987, **15**(3):1281-1295.

236. Puigbo P, Bravo IG, Garcia-Vallve S: **CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation**. *Biol Direct* 2008, **3**:38.
237. Liu G, Wu J, Yang H, Bao Q: **Codon Usage Patterns in *Corynebacterium glutamicum*: Mutational Bias, Natural Selection and Amino Acid Conservation**. *Comp Funct Genomics* 2010, **2010**:343569.
238. Puigbo P, Guzman E, Romeu A, Garcia-Vallve S: **OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences**. *Nucleic Acids Res* 2007, **35**(Web Server issue):W126-131.
239. Choi JM, Han SS, Kim HS: **Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects**. *Biotechnol Adv* 2015.
240. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC: **Industrial enzyme applications**. *Curr Opin Biotechnol* 2002, **13**(4):345-351.
241. Liu L, Yang H, Shin HD, Li J, Du G, Chen J: **Recent advances in recombinant protein expression by *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, and *Streptomyces*: from transcription and translation regulation to secretion pathway selection**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013, **97**(22):9597-9608.
242. Keasling JD: **Synthetic biology and the development of tools for metabolic engineering**. *Metab Eng* 2012, **14**(3):189-195.
243. Exton JH: **Signaling through phosphatidylcholine breakdown**. *J Biol Chem* 1990, **265**(1):1-4.
244. Levine L, Xiao DM, Little C: **Increased arachidonic acid metabolites from cells in culture after treatment with the phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C from *Bacillus cereus***. *Prostaglandins* 1987, **34**(5):633-642.
245. Clark MA, Shorr RG, Bomalaski JS: **Antibodies prepared to *Bacillus cereus* phospholipase C crossreact with a phosphatidylcholine preferring phospholipase C in mammalian cells**. *Biochem Biophys Res Commun* 1986, **140**(1):114-119.
246. el-Sayed MY, DeBose CD, Coury LA, Roberts MF: **Sensitivity of phospholipase C (*Bacillus cereus*) activity to phosphatidylcholine structural modifications**. *Biochim Biophys Acta* 1985, **837**(3):325-335.
247. Hansen S, Hansen LK, Hough E: **The crystal structure of tris-inhibited phospholipase C from *Bacillus cereus* at 1.9 Å resolution. The nature of the metal ion in site 2**. *J Mol Biol* 1993, **231**(3):870-876.
248. Ventura S, Villaverde A: **Protein quality in bacterial inclusion bodies**. *Trends Biotechnol* 2006, **24**(4):179-185.
249. Stephenson K, Carter NM, Harwood CR, Petit-Glatron MF, Chambert R: **The influence of protein folding on late stages of the secretion of alpha-amylases from *Bacillus subtilis***. *FEBS Lett* 1998, **430**(3):385-389.
250. DeLisa MP, Tullman D, Georgiou G: **Folding quality control in the export of proteins by the bacterial twin-arginine translocation pathway**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(10):6115-6120.
251. Chen J, Fu G, Gai Y, Zheng P, Zhang D, Wen J: **Combinatorial Sec pathway analysis for improved heterologous protein secretion in *Bacillus subtilis*: identification of bottlenecks by systematic gene overexpression**. *Microb Cell Fact* 2015, **14**:92.
252. Linton E, Walsh MK, Sims RC, Miller CD: **Translocation of green fluorescent protein by comparative analysis with multiple signal peptides**. *Biotechnol J* 2012, **7**(5):667-676.

253. Mulder KC, Bandola J, Schumann W: **Construction of an artificial *secYEG* operon allowing high level secretion of alpha-amylase.** *Protein Expr Purif* 2013, **89**(1):92-96.
254. Slepko ER, Pavinski Bitar A, Marquis H: **Differentiation of propeptide residues regulating the compartmentalization, maturation and activity of the broad-range phospholipase C of *Listeria monocytogenes*.** *Biochem J* 2010, **432**(3):557-563.
255. Domann E, Leimeister-Wachter M, Goebel W, Chakraborty T: **Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene.** *Infect Immun* 1991, **59**(1):65-72.
256. Kikuchi Y, Date M, Yokoyama K, Umezawa Y, Matsui H: **Secretion of active-form *Streptovorticillium mobaraense* transglutaminase by *Corynebacterium glutamicum*: processing of the pro-transglutaminase by a cosecreted subtilisin-Like protease from *Streptomyces albobogrius*.** *Appl Environ Microbiol* 2003, **69**(1):358-366.
257. Kudla G, Murray AW, Tollervey D, Plotkin JB: **Coding-sequence determinants of gene expression in *Escherichia coli*.** *Science* 2009, **324**(5924):255-258.
258. Chaney JL, Clark PL: **Roles for Synonymous Codon Usage in Protein Biogenesis.** *Annu Rev Biophys* 2015, **44**:143-166.
259. Jacques N, Dreyfus M: **Translation initiation in *Escherichia coli*: old and new questions.** *Mol Microbiol* 1990, **4**(7):1063-1067.
260. Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS: **Global analysis of protein expression in yeast.** *Nature* 2003, **425**(6959):737-741.
261. Lithwick G, Margalit H: **Hierarchy of sequence-dependent features associated with prokaryotic translation.** *Genome Res* 2003, **13**(12):2665-2673.
262. Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J: **Codon bias and heterologous protein expression.** *Trends Biotechnol* 2004, **22**(7):346-353.
263. Angov E, Legler PM, Mease RM: **Adjustment of codon usage frequencies by codon harmonization improves protein expression and folding.** *Methods Mol Biol* 2011, **705**:1-13.
264. Gould N, Hendy O, Papamichail D: **Computational tools and algorithms for designing customized synthetic genes.** *Front Bioeng Biotechnol* 2014, **2**:41.
265. Minihane BJ, Brown DE: **Fed-batch culture technology.** *Biotechnol Adv* 1986, **4**(2):207-218.
266. Luli GW, Strohl WR: **Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations.** *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**(4):1004-1011.
267. Demain A, Davies J, Atlas R (eds.): **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 3 edn. Washington DC: ASM Press; 1999.
268. Andersson L, Yang S, Neubauer P, Enfors SO: **Impact of plasmid presence and induction on cellular responses in fed batch cultures of *Escherichia coli*.** *J Biotechnol* 1996, **46**(3):255-263.
269. Wong HH, Kim YC, Lee SY, Chang HN: **Effect of post-induction nutrient feeding strategies on the production of bioadhesive protein in *Escherichia coli*.** *Biotechnol Bioeng* 1998, **60**(3):271-276.

-
270. Otnaess AB, Little C, Sletten K, Wallin R, Johnsen S, Flengsrud R, Prydz H: **Some characteristics of phospholipase C from *Bacillus cereus***. *Eur J Biochem* 1977, **79**(2):459-468.
271. Kang MS, Han SS, Kim MY, Kim BY, Huh JP, Kim HS, Lee JH: **High-level expression in *Corynebacterium glutamicum* of nitrile hydratase from *Rhodococcus rhodochrous* for acrylamide production**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, **98**(10):4379-4387.
272. Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jurgen B, Kruger E, Schweder T, Hamer G, O'Beirne D *et al*: **Physiological responses to mixing in large scale bioreactors**. *J Biotechnol* 2001, **85**(2):175-185.
273. Schmidt FR: **Optimization and scale up of industrial fermentation processes**. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005, **68**(4):425-435.
274. Schweder T, Kruger E, Xu B, Jurgen B, Blomsten G, Enfors SO, Hecker M: **Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses**. *Biotechnol Bioeng* 1999, **65**(2):151-159.
275. Umakoshi H, Kuboi R, Komazawa I, Tsuchido T, Matsumura Y: **Heat-induced translocation of cytoplasmic beta-galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli***. *Biotechnol Prog* 1998, **14**(2):210-217.